

Untersuchungen über den
photodynamischen Effekt von
Acridinfarbstoffen an Escherichia coli
und Bacillus subtilis

Peter Wallnöfer

1961

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN PHOTODYNAMISCHEN EFFEKT
VON ACRIDINFARBSTOFFEN AN ESCHERICHIA COLI UND
BACILLUS SUBTILIS

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Peter Wallnöfer
aus
München

1961

1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Bukatsch

2. Berichterstatter: Professor Dr. L. Brauner

Tag der mündlichen Prüfung: 10. 5. 1961



UNI-Druck, München 13, Amalienstraße 85

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Einleitung	1
Material und Methodik	2
Versuche und Ergebnisse	6
1. Untersuchung der Farbstoffe	6
2. Untersuchung des Wachstums, des Stickstoff- u. Eiweißstoffwechsels der Bakterien in Hell- u. Dunkelkulturen mit Farbstoffzusatz	13
3. Untersuchung des Gaswechsels	26
4. Untersuchung von Fermentaktivitäten	41
5. Versuche mit Cytochrom c	52
Diskussion	55
Zusammenfassung	58
Literaturverzeichnis	60



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555622_0006

EINLEITUNG

Die Erkenntnis der photodynamischen Wirkung verdanken wir der Entdeckung von O. RAAB (1898), der bei Infusorien eine erhebliche Steigerung der Sterblichkeit durch Acridin feststellte, wenn er die Organismen dem Licht aussetzte. RAABs Versuche wurden darauf von TAPPEINER und seinen Mitarbeitern in größerem Umfang weitergeführt (1904). Es handelte sich um eine völlig neue Lichtwirkung, die TAPPEINER mit dem Namen "Photodynamie" belegte. Dabei wurde erkannt, daß es sich bei diesem Phänomen um eine Oxydationsreaktion handeln mußte, wobei die notwendige Energie durch die Strahlung geliefert wird, welche die Farbstoffe absorbieren. In der Folgezeit entwickelte sich aus diesen Erkenntnissen ein neues Fachgebiet der Strahlenbiologie. REITZ (1908) untersuchte eine große Reihe von Fluoreszenzfarbstoffen und prüfte ihre photodynamische Wirksamkeit erstmals an Bakterien. In den Jahren von 1930 - 1940 kamen die systematischen Untersuchungen von BLUM und Mitarbeitern zum Verständnis des grundlegenden Mechanismus photodynamischer Aktion hinzu. Die theoretischen Grundtatsachen dieses Gegenstandes sind in einer Monographie von BLUM (1941) dargestellt. Die chemische Seite photosensibilisierter Reaktionen wurde in neuerer Zeit von G. O. SCHENK (1953-1958) einer genauen Prüfung unterzogen und weiter geklärt.

Uns interessierte besonders der Einfluß bestimmter Acridinderivate, die in der Bakteriologie und Bodenkunde zum fluoreszenzmikroskopischen Nachweis von Mikroorganismen Verwendung finden (vgl. dazu die einschlägigen Arbeiten von STRUGGER und NETZSCH-LEHNER).

MATERIAL UND METHODIK

Zu unseren Versuchen verwendeten wir Bakterienkulturen von *Escherichia coli* (aus Hyg. Inst. München 1954) und *Bacillus subtilis* (Sammlung Bot. Inst. München 1955). Die Bakterienstämme wurden laufend auf Bouillonagar-Schrägröhrchen gezüchtet und wiederholt mikroskopisch auf ihre Reinheit überprüft.

Als Substrat für die Versuche benutzten wir ausschließlich eine synthetische Asparagin-Nährlösung, um so die durch die Eigenfärbung der Bouillonbrühe entstehende Absorption von bestimmten Lichtbereichen zu umgehen und um möglichst definierte Bedingungen zu schaffen. Die synthetische Grundnährlösung hatte folgende Zusammensetzung:

1000 ml n/10 Phosphatpuffer ($\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$) pH 7,0
für *Bac. subtilis*, pH 6,4 für *E. coli*; + 0,1 g CaCl_2 p. a.
+ 0,3 g MgSO_4 p. a. + 0,002 g FeSO_4 p. a. + 5 g Asparagin
rein. + 4 ml Glycerin. Feste Nährböden enthielten dazu noch
2 % Agar (Stangenform).

Als Kulturgefäße für die Stammkulturen dienten 500 ml Erlenmeyerkolben. Für die einzelnen Lichtversuche wurden Liegekulturflaschen mit annähernd planparalleler Oberfläche und ca. 400 ml Inhalt benutzt.

Wir untersuchten die drei Fluorochrome Acridinorange (AO), Coriophosphin (CP) und Trypaflavin (TF) (Chroma A. G. Stuttgart) auf ihre photodynamischen Eigenschaften. Alle drei Acridinderivate wurden zunächst auf ihre chemische Reinheit chromatographisch geprüft. Die Absorptionsspektren wurden im Beckmann-Photometer ausgemessen.

Als Lichtquellen nahmen wir ausschließlich Leuchtstoffröhren der Firma Philips:

1. Blau (Philips TL 40 W/ 18) λ max 425 nm (1 nm = 1 Nanometer $10^9 \text{ \AA}$)
2. UV A (Philips 40 W) λ max 325 nm
3. Gelb (Philips TL 40 W/ 16) λ max 599 nm

Für die verschiedenen Belichtungsversuche verwendeten wir jeweils ein Leuchtstoffröhrenaggregat von 5 Lampen.

1. Zur Messung der Strahlung stand ein geeichtes Thermosäulen-Galvanometersystem zur Verfügung. Wir benutzten die Groboberflächen-Thermosäule E von Kipp und Zonen, Delft, Holland, und als Galvanometer das bekannte¹ Multiflexgalvanometer vom Typ MGO (Lange, Berlin).

2. Die Wachstumszunahme wurde nephelometrisch mit einem Kolorimeter Typ Lange Universal gemessen (1 ml Kuvette). Ebenfalls mit diesem Instrument prüften wir kolorimetrisch die Farbstoffaufnahme (5 ml Kuvette).
3. Zur Bestimmung des Gaswechsels wurde eine Licht-Warburg-Apparatur mit Möglichkeit zum Wechsel von Leuchtstoffröhren (Fa. Braun, Melsungen) verwendet. Die aeroben Versuche erfolgten mit 0,3 ml KOH (10 %ig) als CO_2 Absorber. Die anaeroben Versuche wurden in Stickstoffatmosphäre vorgenommen, wobei das Manometersystem und die Bakteriensuspension mit gereinigtem Stickstoff durchspült wurden.
4. Wir trennten die Bakterien mittels einer hochtourigen Zentrifuge bei einer Umdrehungszahl von 10 000 U/Min. vom Substrat. Das Zentrifugat wurde je nach Verwendungszweck ein- bis dreimal mit Aqua dest. nachgewaschen. Die Bakterien wurden je nach Untersuchung auf verschiedene Weise weiterverarbeitet. Die Stickstoffbestimmung führten wir nach der Mikromethode von Kjeldahl durch. Dabei wurde die Bakterienmasse bei 100°C 24 h lang getrocknet, für chromatographische Untersuchungen des Eiweißstoffwechsels gegebenenfalls neutralisiert und nach abermaliger eintägiger Trocknung gewogen (Neutral bei Aminosäure, frakt. b).
5. Die Hydrolyse der Eiweißsubstanz des Trockenrückstandes der Bakterien nahmen wir nach der Vorschrift von Cramer (1958) vor. Die chromatographische Trennung und Identifizierung der Aminosäuren wurde in drei Fraktionen durchgeführt:
Fraktion a: Aminosäuren, die in die Kulturflüssigkeit ausgeschieden wurden,
Fraktion b: Freie Aminosäuren des Cytoplasmas, Extraktion mit 75 %igem Äthanol nach Zerreiben mit feinstem Seesand,
Fraktion c: Aminosäuren des Eiweißhydrolysats.

Als Chromatographier-Papier benutzten wir Schleicher u. Schüll Papier 2043 b, als Laufmittel für die Aminosäuren folgende Gemische:

1. Butanol-Eisessig-Wasser (40-10-50)
2. a-Picolin (70 a-Picolin, 28 H_2O , 2 konz NH_3)
3. Phenol (80 %, H_2O gesätt.)
4. Isopropanol-Eisessig - H_2O (70-10-20)

Als Entwickler für Aminosäuren nahmen wir:

1. Ninhydrin (75 mg Ninhydrin, 25 ml Äthanol (95 %); 0,1 ml HCl (10 %)).
2. Reagenz nach Folin (0,2 g Na-naphthochinonsulfat (Merck), 5 g NaCO_3 wasserfrei in 100 ml Aqua dest.).

6. Wir bestimmten die Fermentaktivitäten in vivo und in vitro. Die Extraktion

der Fermente erfolgte nach mechanischer Zerkleinerung der Bakterien mit Seesand mit Phosphatpuffer pH 7,0 bis 7,6 unter Eiskühlung und bei Zugengesein von Toluol.

- a. Die Aktivität der Katalase wurde einerseits titrimetrisch in vitro mit KMnO_4 (n. OPARIN), andererseits gasometrisch in vivo bestimmt, wobei in beiden Fällen H_2O_2 als Substrat Verwendung fand (BELOSERSKI: Prakt. d. Biochemie d. Pflanzen).
- b. Die Aktivität der Glutaminsäure-Oxalessigsäure Transaminase prüften wir nach der Anilincitrat-Methode (RAUEN: Biochem. Taschenbuch S. 988).
- c. Die Dehydrogenasenaktivität wurde mit der Thunberg-Methode bestimmt, wobei wir als Wasserstoff-Donator eine n/10 Na-Succinatlösung benutzten. Je 0,8 - 1,2 ml Methylenblau (Konz. 1 : 10 000) wurden 3 oder 4 ml Bakteriensuspensionen beigegeben.

Ferner verwendeten wir in mehreren Versuchen als Sauerstoff-Akzeptoren Hydrochinon, Pyrogallol, Paramethyldiamin, Cystein, und Ascorbinsäure. Sämtliche genaueren Aktivitätsbestimmungsmethoden von Fermenten, die kolorimetrischer Art waren, mußten wegen der starken Verfärbung der Versuchslösung durch die drei Fluorochrome ausscheiden.

7. Zu einer Untersuchung von Oxydations- bzw. Reduktionseigenschaften der Acridinderivate wurde Cytochrom c (v. Biochem. Inst. d. Univ. München, isoliert aus Rinderherzen) herangezogen. Na-dithionit diente als Reduktionsmittel. Für die Oxydation wurde die Cytochromlösung angesäuert und kräftig mit Sauerstoff durchspült. Die Absorptionsbanden des Cytochrom c wurden bei 550 nm im Beckmann-Photometer gemessen.

Zusatzblatt zu Material und Methodik

zu 1. (Messung der Strahlung)

Da die Grobflächen-Thermosäule E_1 von Kipp und Zonen mit aufgesetztem Tubus einen linearen Öffnungswinkel von 44° aufweist, konnten wir nur Lichtmessungen oberhalb eines Mindestabstandes von 2 m durchführen. Messungen unterhalb der angegebenen Entfernung bringen keine Genauigkeit mehr, da das Entfernungsgesetz bei nicht punktförmiger Strahlungsquelle keine Gültigkeit mehr besitzt. Aus diesen Gründen wird ersichtlich, daß diese Thermosäule für die Messung von Leuchtstoffröhrenlicht schlechter geeignet ist und so mit einem größeren Fehler gerechnet werden muß. Wir gingen so vor, daß wir beim 2 m - Abstand einheitlich für alle drei Leuchtstoffröhren (Gelb, UV A und Blau) die Lichtintensität in $\text{erg/cm}^2 \cdot \text{sec.}$ mit Hilfe des Thermosäulen-Galvanometersystems feststellten und dabei dieselben Messungen mit einem Luxmeter (Photo-

element s 145 Dr. B. Lange) vornahmen. Die Lichtmengen unserer Versuchsbedingungen bestimmten wir mit dem Luxmeter allein und brachten die Meßwerte mit der vorher ermittelten Beziehung Thermosäule-Luxmeter in Relation.

i = 1:	Abstand zur Lichtquelle	4,15 cm (davon 1,6 cm Luft, 0,5 cm Glas, 2,05 cm H ₂ O)
		Blau: 4500 erg/cm ² .sec
		UV A: 3230 " " "
		Gelb: 1885 " " "
i = 2:	" " "	12 cm (davon 0,3 cm Glas)
		Blau: 3560 erg/cm ² .sec
i = 3:	" " "	20 cm (davon 0,3 cm Glas)
		Blau: 3060 erg/cm ² .sec

Setzen wir das Blaulicht der Dosis 1 gleich 100 %, so erreichen UV A 71,7 %, Gelb 41,8 % des Blaulichts.

VERSUCHE UND ERGEBNISSE

1. Untersuchung der Farbstoffe

Zunächst wurden die drei Fluorochrome Acridinorange, Trypaflavin und Coriphosphin, um sie auf ihre chemische Reinheit zu prüfen, einer chromatographischen Trennung unterzogen. Die Identifizierung der einzelnen Farbstoffkomponenten und das geeignete Lösungsmittelgemisch wurde den Angaben, die LE-DERER (1953) veröffentlichte, entnommen. Demnach wurde als Trennungsgemisch Butanol-Eisessig-Wasser im Verhältnis 4 : 5 : 1 verwendet. Als Chromatographierpapier, erwies sich das dem Whatman-Papier Nr. 1 entsprechende Schleicher und Schüll Papier 2043 b als besonders geeignet.

Es zeigte sich, daß alle drei Acridinderivate nur sehr bedingt als "rein" anzusehen sind. Vielmehr stellen sie ein Gemisch mehrerer Acridin-Farbstoffe dar. Acridinorange enthält nur in verhältnismäßig geringen Spuren Beimengungen, während Coriphosphin zu gut einem Drittel aus anderen Acridinderivaten besteht. Bei Betrachtung des Chromatogramms im UV-Licht ergibt sich folgendes Bild (Abb. 1):

Trypaflavin	RF	Acridinorange	RF	Coriphosphin	RF
(1) strk. gelbgrün fluoresz. (Acriflavin)	0,56	(1) strk. orangerot 3,6Diamin. methylacrid.	0,73	(1) strk. gelbgrün Acriflavin	0,56
(2) schwach grün (unbekannt)	0,66			(2) strk. orange gelb Chrysanilin	0,64
				(3) schwach gelb (unbekannt)	0,77

Tabelle

Demnach kann man Coriphosphin als ein Gemisch von Chrysanilinen und Acriflavin bezeichnen.

Alle drei Fluorochrome sind zu den basischen oder kathodischen Fluoreszenzfarbstoffen zu rechnen. Um die Zugehörigkeit eines Fluorochroms zu den kathodischen (basischen) oder anodischen (saureren) Farbstoffen festzustellen, be-

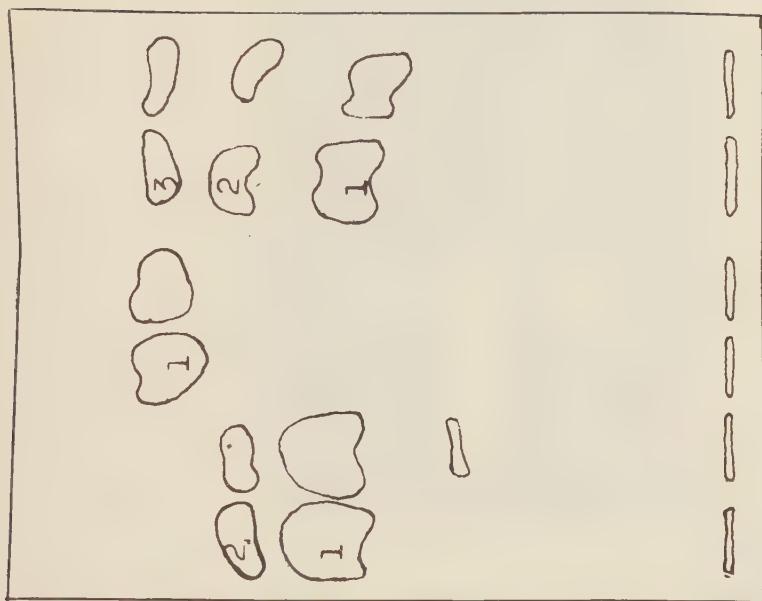
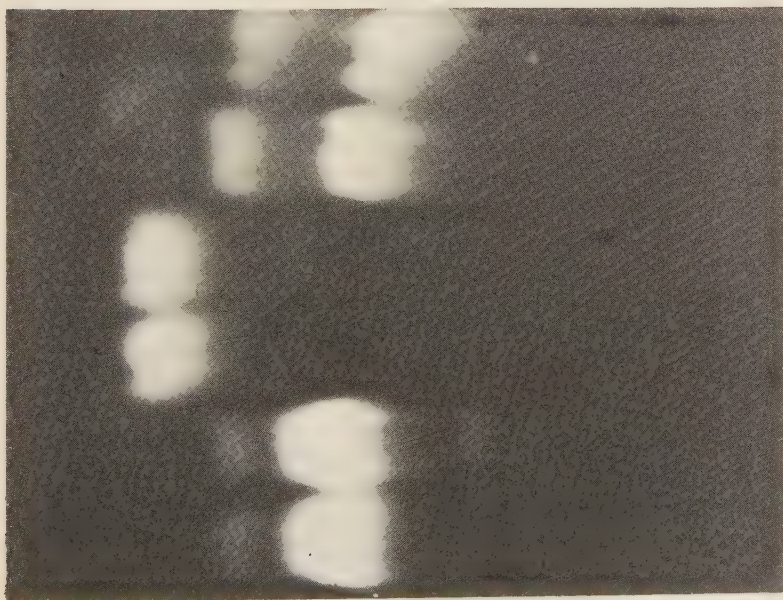


Abb. 1: von 1 nach r TF D, TF B, AO D, AO B, CP D, CP B^{†)} siehe Tabelle
Belichtung 60 Min. (i = 2).

^{†)} B = belichtet, D = dunkel

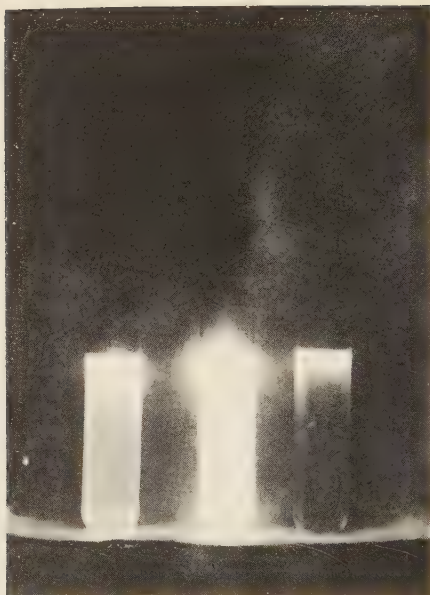


Abb. 2: von 1. nach r. TF pH 2,2; 7,0; 10,2

dient man sich am besten der Liesegangschen Kapillarprobe (1943). Zählt ein Fluorochrom wie zum Beispiel unsere drei verwendeten Acridinderivate AO, TF, CP, zu den kathodischen, so breitet sich der fluoreszierende Anteil der Lösung, wenn sie auf ein Filterpapier aufgetropft worden ist, wesentlich langsamer aus, als das Lösungsmittel Wasser. Infolgedessen ist im Filtrierpapier beim fertig ausgebreiteten Tropfen ein stark fluoreszierender Kern mit einem mehr oder weniger breiten Wasserrand an der Peripherie zu beobachten, welcher nicht fluoresziert. Fluoreszierender Anteil ist bei diesen Farbstoffen, die in wässriger Lösung mehr oder weniger stark dissoziiert sind, das Kation.

Bei Untersuchungen der Fluoreszenzeigenschaften der drei Photosensibilisatoren ergab sich einheitlich im neutralen pH-Bereich zwischen 6,6 und 7,4 die stärkste Fluoreszenzhelligkeit, während sie im sauren und alkalischen Bereich stark abnahm (Abb. 2).

Um das photodynamisch wirksame Licht zu ermitteln, wurden die Absorptionsspektren der drei Fluorochrome in einem Bereich von 1000 bis 325 nm ausgemessen. Hierbei treten bei allen drei Farbstoffen einheitlich ein schwächeres Maximum im langwelligeren Rotlicht und ein äußerst intensives im blauen Spektralbereich auf. Das Absorptionsmaximum für Acridinorange liegt bei 490 nm. Coriophosphin hat ein zweigipfliges Maximum, was bereits die starke Beimengung

anderer Acridinkomponenten erwarten läßt, nämlich bei 495 und 450 nm. Das Maximum bei 450 nm ist auf die starke Acriflavinbeimengung zurückzuführen. Trypaflavin zeigt seine größte Absorption ebenfalls bei 450 nm. Die Messungen führten wir von je 0,88 mg Farbstoff, gelöst in 10 ml n/10 Phosphatpuffer pH 7,0 durch. Allerdings tritt für alle drei Photosensibilisatoren auch noch ein drittes Absorptionsmaximum im UV-Bereich auf. (Abb. 3) Zu bemerken ist, daß das Emissionsmaximum der Philips Leuchtstoffröhre UV A gerade im Absorptionsminimum der drei Farbstoffe liegt.

Zunächst wurden die Farbstoffe ohne lebenden Organismus auf ihr Verhalten im Licht hin überprüft. Der Tatsache folgend, daß ein Photosensibilisator nur in dem Spektralbereich wirksam ist, in dem er selbst absorbiert, wurden die weiteren Bestrahlungen mit Blaulicht vorgenommen. Für unsere Versuche erwies sich die von der Fa. Philips zu Reklamezwecken herausgebrachte Leuchtstoffröhre TL 40W/18 als besonders günstig, da sie für alle drei Farbstoffe zusammen sehr wirksames Licht erzeugt. Um eine eventuelle Lichtzersetzung der Farbstoffe beobachten zu können, stellten wir für alle drei Fluorochrome Eichkurven auf, die uns ein annähernd genaues Maß für den Farbstoffgehalt lieferten. Es wurden dabei Farbstoffverdünnungsreihen hergestellt und deren Extinktion gemessen. Auf halblogarithmischem Papier aufgetragen, ergaben die Werte eine Gerade. Der Knick bei der Eichkurve von Trypaflavin könnte in einer, bei einer bestimmten Konzentration auftretenden (Fluoreszenzänderung oder) Polymerisationserscheinung gedeutet werden. Bei den Messungen zur Eichkurve von AO und CP verwendeten wir ein Grünfilter (Schott u. Gen. VG 9 max ca. 528 nm), bei TF ein Blaufilter (Schott u. Gen. BG 12 max ca. 415 nm). (Abb. 4a)

Farbst.	Farbst. Vorgabe	Lichtzers.
AO	1,70 mg	0,68 mg
CP	1,40 mg	0,45 mg
TF	1,90 mg	1,46 mg

Bei einer Bestrahlungsdauer von 60 Minuten ($i = 2$) im wirksamen Spektralbereich "Blau", zeigte sich bei allen Farbstoffen, die in n/10 Phosphatpuffer pH 7,0 gelöst waren, eine deutliche Lichtzersetzung, die bei Trypaflavin sogar erheblich war.

Bei einer sofortigen chromatographischen Trennung vorbelichteter Farbstoffe entstanden, außer bei Trypaflavin, keine sichtbaren Spaltprodukte (Abb. 1). Lediglich die Fleckenintensität, d.h. die Fluoreszenzhelligkeit, war in Dunkelkontrollen der Farbstoffe etwas größer.

Um die Rolle des molekularen Sauerstoffs in einem photodynamischen Akt ge-

Absorptionsspektre
von AO, TP u. CP
0,88mg in 10ml H₂O pH 7,0

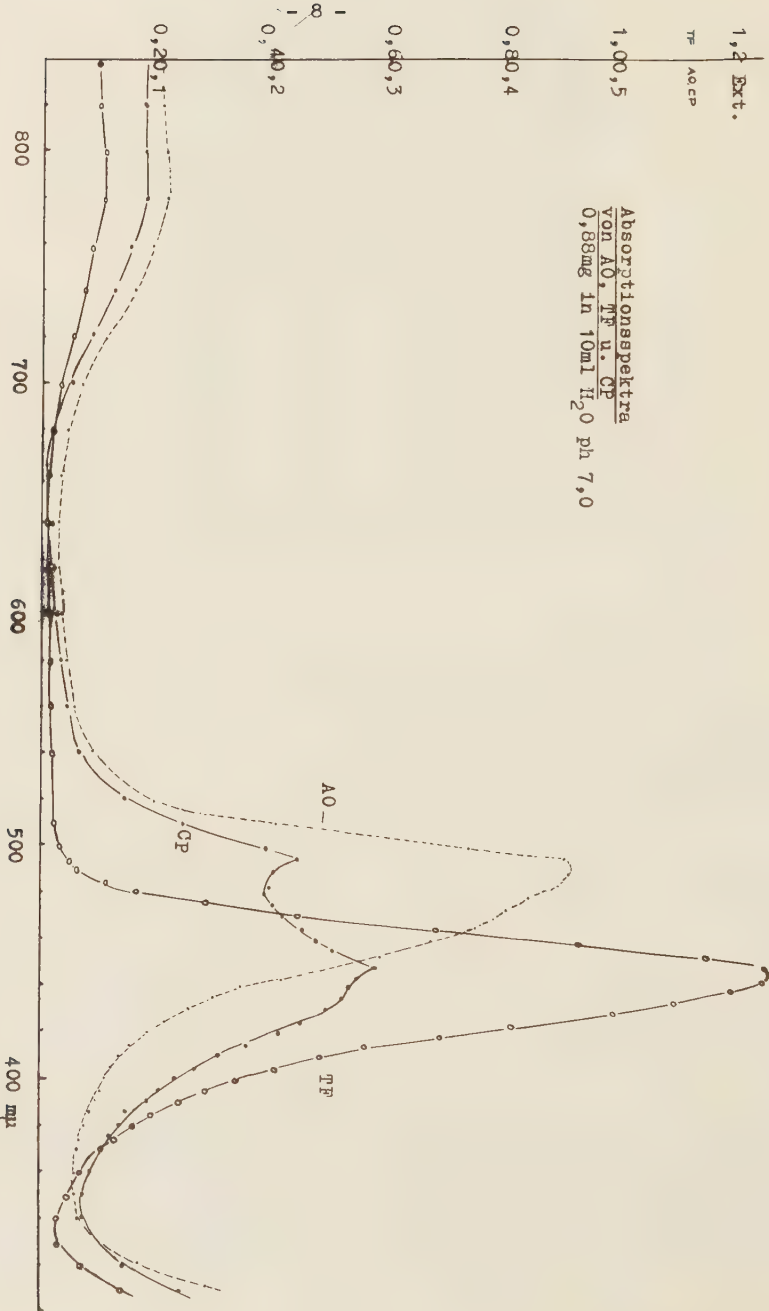
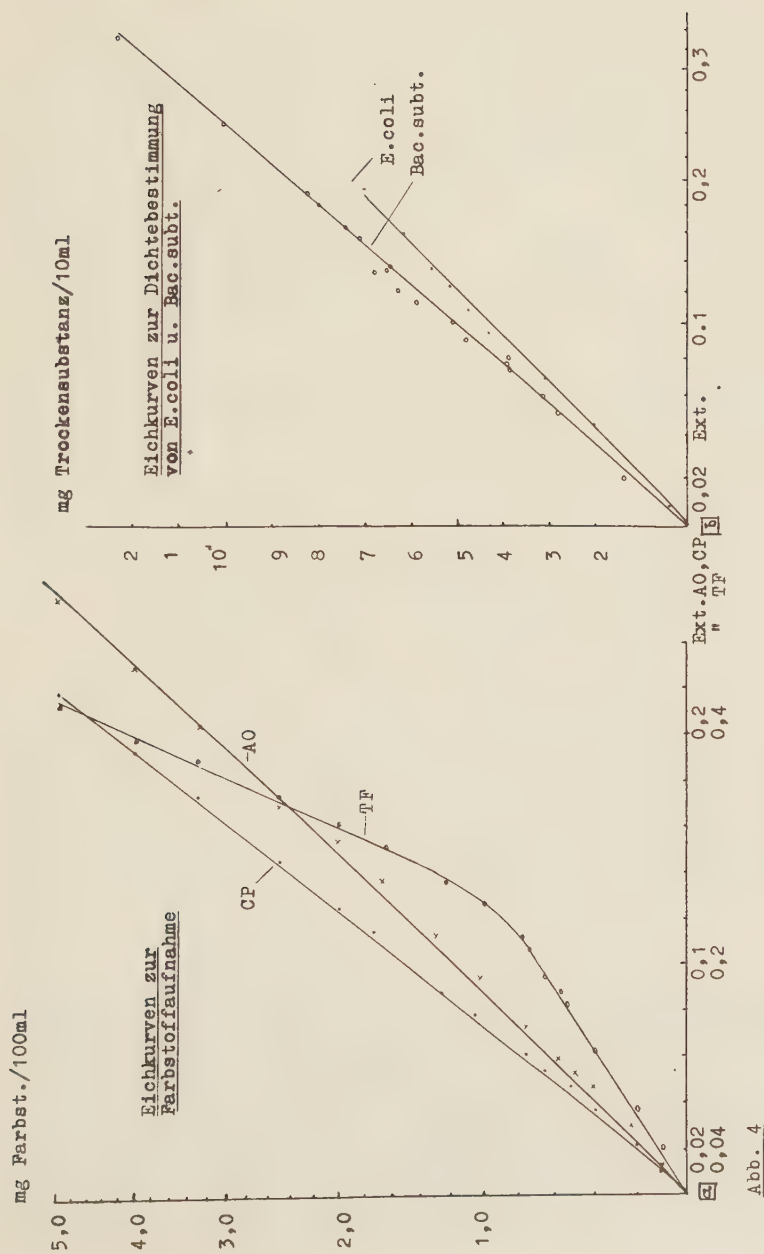
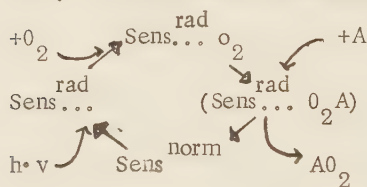


Abb. 3



nauer zu studieren, wurden manometrische Versuche in einer Licht-Warburg-Apparatur vorgenommen. Vorauszuschicken ist jedoch, daß von SCHENK (1953-57) entwickelte Übertragungsschema, das photodynamische Prozesse besser verständlich macht. Demnach geht ein photodynamisch wirksamer Stoff $\text{Sens.}^{\text{norm}}$ bei Belichtung ($h \cdot \nu$) in ein phototropisomeres Diradikal $\text{Sens.}^{\text{rad}}$ über, das in der ersten Dunkelreaktion auf Grund seiner Affinität zu molekularen Sauerstoff eine reaktionsfähige, labile Verbindung $\text{Sens.}^{\text{rad}} \cdot \text{O}_2$ eingeht. $\text{Sens.}^{\text{rad}} \cdot \text{O}_2$ reagiert mit einem Akzeptor A unter Bildung von AO_2 und unter Rückbildung von $\text{Sens.}^{\text{norm}}$.



Übertragungsschema n. SCHENK

Als erstes prüften wir die Farbstoffe ohne Sauerstoffakzeptor im neutralen pH-Bereich im Licht-Warburg und setzten sie

Zeit min.	TF mm ³ O ₂	CP mm ³ O ₂	AO mm ³ O ₂	
0-5	0,00	0,00	0,00	dunkel
10	4,72	3,80	3,75	hell
15	2,04	2,76	3,82	"
20-25	0,00	0,00	0,00	dunkel
25	2,01	2,03	2,79	hell
30	2,02	2,07	2,79	"
35	4,72	4,14	2,30	"

Tabelle: O₂-Aufn. v. TF, CP, AO (0,5 mg). Belicht. i = 1

einer periodischen Belichtung im wirksamen Strahlenbereich "Blau" aus. Es zeigte sich tatsächlich, daß im Moment der Belichtung von den Fluorochromen Sauerstoff gebunden wurde. Die aufgenommenen Sauerstoffmengen blieben recht gering, lagen aber dennoch in meßbaren Bereichen. Im Einklang mit der beobachteten Zersetzung im Licht könnte es sich in diesem Falle, da ja wirklich Sauerstoff verbraucht wird, um eine Oxydation der Farbstoffe handeln, zudem kein geeigneter Sauerstoffakzeptor zugegen ist, der den laut Übertragungsschema an $\text{Sens.}^{\text{rad}}$ addierten Sauerstoff aufnehmen könnte (Tabelle).

Durch Zugabe geeigneter O₂-Akzeptoren wurde die Sauerstoffaufnahme und

-übergabe durch die Farbstoffe verdeutlicht. Auch in dieser Versuchsreihe bestrahlten wir periodisch mit wirksamem Blaulicht. Hydrochinon als O_2 -Akzeptor zeigte relativ geringe Affinität dem aktivierten Sauerstoff gegenüber. Pyrogallol hingegen wies eine wesentlich größere Affinität zum photodynamisch übertragenen Sauerstoff auf. Da jedoch Pyrogallol schon allein bei Bestrahlung mit wirksamem Licht einer starken Autoxydation unterliegt und demzufolge ein zusätzlicher O_2 -Verbrauch auftrat und abgezogen werden mußte, war es als Sauerstoffakzeptor in unseren Versuchen weniger gut geeignet. Außerdem trat durch das entstehende Purpurogallin eine Verfärbung ein, die das Absorptionsvermögen der Acridinderivate störte. Wir wählten deshalb einen O_2 -Akzeptor, der weniger autoxydabel ist und vor allem keine gefärbten Oxydationsprodukte ergibt, nämlich Cystein. Auch hier war die O_2 -Übergabe während der Belichtung beträchtlich (Abb. 5). Wie auch beim Pyrogallol, zeigte Trypaflavin bei Cystein als O_2 -Akzeptor während der Belichtung die größte Sauerstoffübergabe. Wir konnten bei Cysteinzusatz keine ins Gewicht fallende "Photooxydation" der drei Fluorochrome, die sich in einer deutlichen Trübung des Farbstoffbades äußert, beobachten. Folglich mußten die durch die Belichtung sensibilisierten Farbstoffe nach ihrer O_2 -Abgabe an den Akzeptor analog dem Schenkschen Übertragungsschema immer wieder in ihren ursprünglichen Zustand zurückkehren. Beim Fehlen eines geeigneten O_2 -Akzeptors würde der Farbstoff demnach photooxydiert werden, was sich in einer stetig geringer werdenden, kolorimetrisch ermittelten Konzentration des Farbstoffbades äußert. Belichtet man größere Farbstoffmengen von Trypaflavin mit und ohne Cysteinzusatz und vergleicht anschließend die Fluoreszenzhelligkeit der belichteten und dunklen Farbstoffbäder der gleichen Anfangskonzentration, so kann man deutlich feststellen, daß die Dunkelkontrollen und die Farbstofflösung mit Cystein ungefähr dieselbe Fluoreszenzhelligkeit aufweisen. Der bestrahlte Farbstoff ohne Cysteinzusatz als Sauerstoffakzeptor zeigte starke Trübung, hervorgerufen durch einen Niederschlag von Photooxydationsprodukten und dadurch bedingte Fluoreszenzminderung (Abb. 6, 7).

2. Untersuchung des Wachstums, des Stickstoff- und Eiweißstoffwechsels der Bakterien in Hell- und Dunkelkulturen mit Farbstoffzusatz

Den Ergebnissen der Untersuchungen mit den Farbstoffen allein folgend, wurden in weiteren Versuchsreihen, die durch die Acridinderivate während einer Belichtung verursachten photodynamischen Auswirkungen auf Kulturen von *E. coli* und *Bac. subtilis* untersucht. Im folgenden beschäftigten wir uns zuerst mit dem

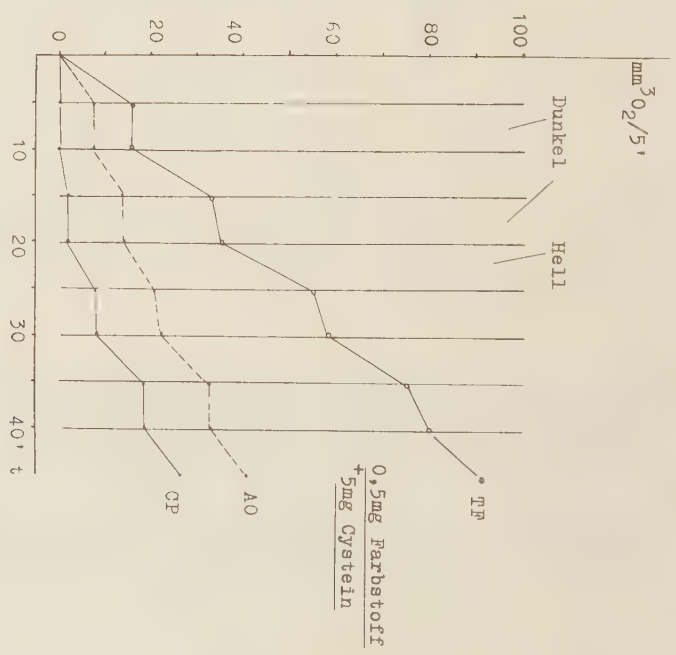
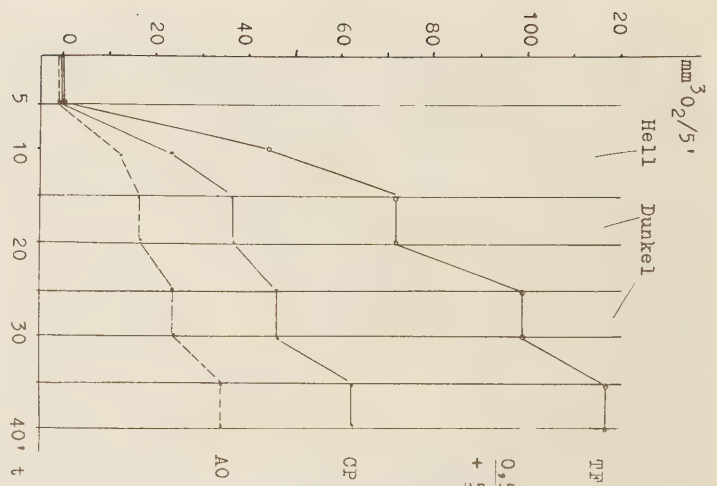


Abb. 5 : O₂-Verbrauch von 0,5 mg Farbstoff mit Cystein- und Pyrogallolzusatz. Versuchst. +26,9°C, Schüttelfr. 110/Min. Belichtung i = 1

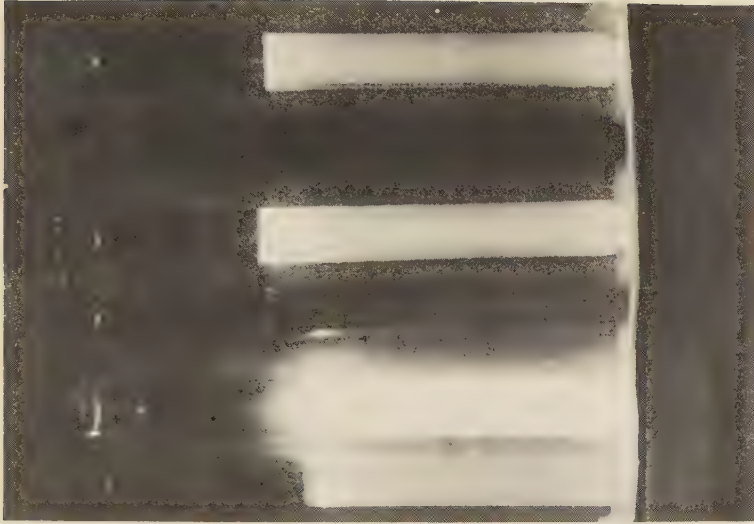


Abb. 7 von 1. nach 1. TF B, TF D, CP B,
CP D, AO B, AO D. Belicht.
60 Min. ($i = 2$)

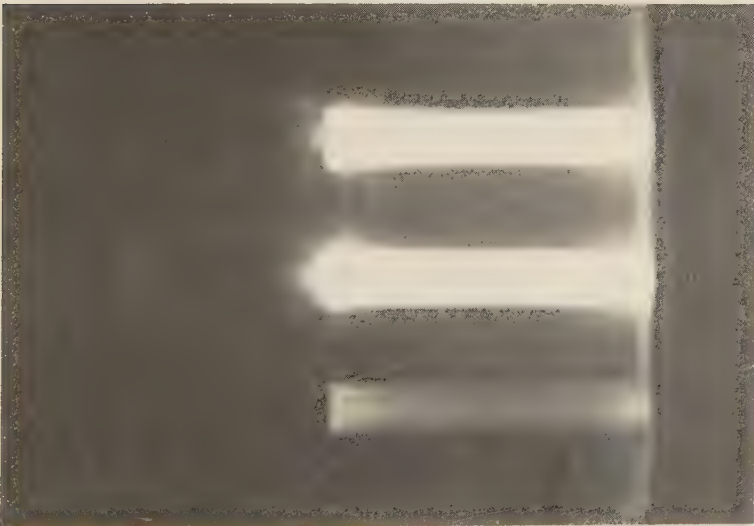


Abb. 6 von 1. nach 1. TF B, TF D,
TF B + 30 mg Cystein. Belicht.
40 Min. ($i = 2$)

Einfluß der Farbstoffe in Hell- und Dunkelkulturen auf die Wachstumsrate der Bakterien.

Zunächst wurde die möglicherweise vorhandene Giftwirkung der drei Fluorochrome, die auch ohne Belichtung auftritt, untersucht. Eine Farbstoffkonzentration von 1 : 10 000 ergab eine starke, anfängliche Wachstumshemmung der Bakterien, wie sie auch BOGEN (1953) für mit AO behandelte Hefekulturen beschreibt. Allerdings setzten bei den Bakterienkulturen nach einer 15-24-stündigen Anfangshemmung (die Zeit variiert je nach dem Alterszustand der Bakterien) stets Adaptationen der Bakterien an die Farbstoffe ein, so daß nach mehrtägiger Kulturdauer die Wachstumsrate der Kontrollen erreicht oder manchmal überschritten wurde. Nach BOGEN (1955) könnte dieses Phänomen der Adaptation dahingehend gedeutet werden, daß Zellen in der Suspension vorhanden sind, die dem Zugriff der Fluorochrome entzogen sind. Sie überleben und werden zu einem beschleunigten Wachstum angeregt. Es kann nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, daß es sich dabei um mutierte Zellen handelt. MARCOVICH (1953) zeigte jedoch, daß AO, im Gegensatz zum Euflavin (EPHRUSSI 1951) wohl toxisch, nicht aber mutagen wirkt.

Die Dichte der Bakteriensuspensionen wurde laufend nephelometrisch bestimmt. Um einen annähernd günstigen Vergleichswert in mg Trockensubstanz zu erhalten, stellten wir eine Verdünnungsreihe verschiedener Suspensionsdichten her und ermittelten für jeden gemessenen Extinktionswert das zugehörige Trockengewicht. Damit wir auch für Farbstoffkulturen einigermaßen zufriedenstellende Werte erhielten, schalteten wir vor die Lichtquelle des Kolorimeters ein Rotfilter (Schott u. Gen. RG max ab 620 - 640 nm), dessen Licht im Absorptionsminimum der drei Fluorochrome lag. Allerdings erlitten die einzelnen Werte durch die geringere Streuung dieser verhältnismäßig langwelligen Strahlung in ihrer Genauigkeit eine Einbuße, so daß die erhaltene Eichkurve uns nur angenäherte Werte lieferte (Abb. 4).

Niedriger gewählte Farbstoffkonzentrationen drückten die Dauer der Anfangshemmung des Wachstums erwartungsgemäß herab. So betrug die Anfangshemmung in Kulturen mit der häufig gewählten Farbstoffverdünnung von 1 : 20 000 nur 10-12 Stunden mit anschließender Adaptation. Konzentrationen von 1 : 40 000 und 1 : 80 000 zeigten nur mehr geringe Wachstumshemmungen. Bei Verdünnungen von 1 : 100 000 war zumeist kein Unterschied zur Wachstumsintensität der Kontrolle mehr zu erkennen (Abb. 8). In allen Fällen verhielten sich *E. coli* und *Bac. subtilis* recht ähnlich, wobei sich *Bac. subtilis* den Farbstoffen gegenüber etwas empfindlicher zeigte. Die Dunkelgiftwirkung war bei Acridinorange etwas geringer, als bei Coriphosphin und Trypaflavin,

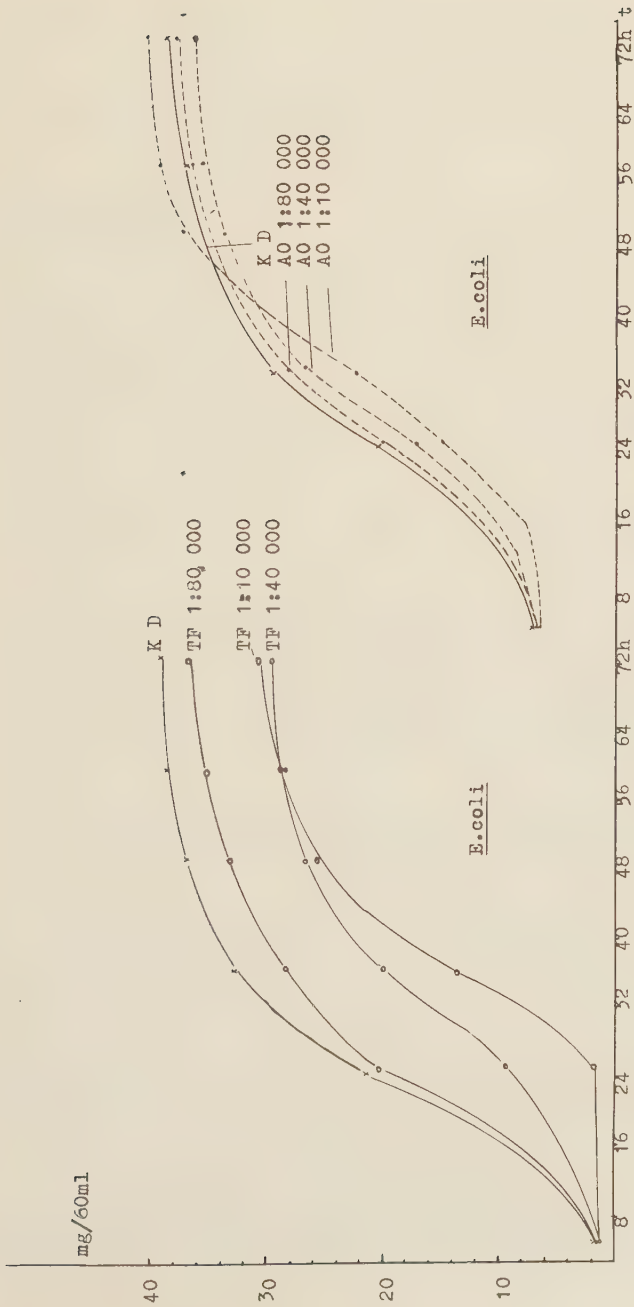


Abb. 8 : Wachstum von *E. coli* bei verschiedenen Farbstoffkonz. Belichtung = 0

was wohl in der starken Acriflavinkomponente letzterer begründet sein mag. Versuche, die in verschiedenen pH-Bereichen (pH: 4,6; 6,4; 11,2) vorgenommen wurden, brachten, nachdem die Bakterien an die Farbstoffe adaptiert waren, keine von der Kontrolle abweichenden Ergebnisse (jedoch Wachstum nur bei pH 4,6; 6,4).

Farbst.	E.coli Aufn.	Fac.subt. Aufn.	
TF	0,87 mg	0,60 mg	
CP	0,91	0,75	
AO	0,80	0,65	
E.coli 10,5 mg in 29 ml H ₂ O Bac. subt. 9,0 mg pH 7,0. Farbst. vorg. 1 mg, Färbezeit 60 Minuten			
Farbstoffaufn. v. E.coli, Bac. subt.			

Gleichzeitig wurde bei den Dunkelversuchen die jeweilige Farbstoffaufnahme durch die Bakterien festgestellt. Bereits nach kurzer Zeit waren die Bakterien voll angefärbt. In vielen Fällen vermochte Bac. subtilis mehr Farbstoff zu speichern. Diese Tatsache würde in vollem Einklang mit den neueren Erkenntnissen über die Struktur von Zell-

membranen bei Bakterien stehen. Bei Gram + Bakterien, zu denen auch Bac. subtilis zählt, vermögen wohl Stoffe aus dem Außenmedium durch die Zellmembran in die Zelle einzudringen, können aber nicht in demselben Maße herausdiffundieren. Gram - Bakterien (E.coli) besitzen eine durchlässigere Zellmembran, so daß ein Stofftransport in beiden Richtungen gleich ermöglicht ist.

Unter den drei Photosensibilisatoren speicherten die Bakterien in der Regel Coriphosphin in größerer Menge als die anderen Fluorochrome.

Vor den entsprechenden Lichtversuchen bestrahlten wir Bakteriendichtsaaten auf Agarplatten, denen jeweils Farbstoffe in der Konzentration von 1 : 20 000 beigegeben waren, über einen Zeitraum von 24 Stunden ($i = 3$) mit wirksamem Blaulicht. Als eine gute Probe auf die Lebenstätigkeit von Mikroorganismen mag die Reduktion von Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) als Maß für die Dehydrogenasenaktivität gelten (LINDEMANN 1953). Im Falle einer Reduktion tritt eine deutliche Rotfärbung auf. Nach einer mit TTC vorgenommenen Prüfung auf Stoffwechsellätigkeit ergaben die Lichtkulturen den dunklen Farbstoffkontrollen gegenüber eine weitgehende Hemmung der Lebenstätigkeit.

Um bei den Wachstumsversuchen der sogenannten Dunkelreaktion, d. h. der Dunkelgiftwirkung entgegenzutreten, mußten geeignete Versuchskonzentrationen gewählt werden, die die Dunkelgiftwirkung weitgehend ausschalteten,

aber dennoch deutlich photodynamische Schäden verursachten. Bekanntlich bewirken viele fluoreszierende Substanzen ähnliche Vergiftungserscheinungen, ohne dem Licht ausgesetzt zu sein. Die erforderliche Konzentration für diese Dunkelreaktion ist gewöhnlich viel höher, als man sie bei einem Belichtungsversuch braucht. Daß jedoch eine photodynamische Schädigung nicht nur eine Verstärkung dieser Dunkelreaktion ist, wird aus den Versuchen klar (BLUM u. MC. BRIDE 1931, zit. bei CLARE 1956), in denen letztere molekularen Sauerstoff nicht benötigt.

Bakteriensuspensionen von *E. coli* und *Bac. subtilis* wurden bei einer Farbstoffkonzentration von AO, TF, CP 1 : 20 000 im Strahlungsbereich "Blau" einer 24-stündigen Belichtung ($i = 3$) ausgesetzt. Die bestrahlten Bakterienkulturen wiesen in allen Fällen eine starke Anfangshemmung des Wachstums auf, während die belichtete Kontrolle ohne Farbstoff einen normalen Wachstumsverlauf beibehielt. Es erfolgte aber selbst bei diesen hohen Strahlendosen fast immer eine Adaptation. In diesem Falle mußte die laufende Farbstoffzersetzung im wirksamen Blaulicht und die so auftretende, fortschreitend geringer werdende Konzentration der Farbstofflösung langsam zunehmendes Wachstum ermöglichen; zudem traten dann noch die in den Dunkelversuchen beobachteten Adaptationen auf. Lediglich bei sehr geringen Anfangsdichten der Bakteriensuspensionen von *E. coli* und *Bac. subtilis* blieben die Kulturen bei 24-stündiger Belichtung steril, zeigten aber nach Überimpfung auf Agarplatten in vielen Fällen nach längerer Bebrütungsdauer wieder beginnendes Wachstum. Um die unkontrollierbare Farbstoffzersetzung während der Belichtung weitgehend einzuschränken, wurde eine wesentlich geringere Bestrahlungsdauer von etwa 65 Min. ($i = 2$) gewählt. Die Belichtungen nahmen wir unmittelbar nach dem Beimpfen der Kulturgefäße vor. Auch hier traten wieder typische Anfangshemmungen des Wachstums bei den Lichtkulturen auf. *E. coli* und *Bac. subtilis* brachten weitgehend übereinstimmende Versuchsergebnisse; ebenso konnten wir bei den drei Photosensibilisatoren keine Unterschiede hinsichtlich ihrer photodynamischen Giftwirkung erkennen. Nach etwa 10-20 Stunden (die Dauer der Anfangshemmung war jeweils von der Menge der überimpften Bakterien abhängig) war in den bestrahlten Kulturen eine beginnende Adaptation der Bakterien zu erkennen. Dabei erzielten die Lichtkulturen nach durchschnittlich zwei bis drei Tagen dieselbe Wachstumsintensität, wie die entsprechenden Dunkelkontrollen. Um die Dunkelgiftwirkung der Farbstoffe auszuschalten, wählten wir für diese Versuchsreihe eine Farbstoffkonzentration von 1 : 100 000. Die Bakterien wurden jeweils in einer n/10 Phosphatpufferlösung pH 7,0 gezogen, um stärkeren pH-Schwankungen entgegenzuwirken. Trotzdem beobachteten wir nach Versuchsbeendigung in

der Regel eine pH-Steigerung auf pH 8,0 - 8,2 (Abb. 9, 10).

Nach den Untersuchungen, die einen eindeutig schädlichen Einfluß der drei Photosensibilisatoren im wirksamen Spektralbereich auf das Bakterienwachstum erkennen ließen, prüften wir in Ergänzung zu diesen Versuchen den Stickstoff- und Eiweißstoffwechsel photodynamisch geschädigter Bakterien. So konnte BOGEN und KESER (1953) in Dunkelversuchen nachweisen, daß in Hefezellen bei Zugegensein von Acridinorange Störungen im Stickstoff- und Eiweißhaushalt auftreten, die sich in einem Proteinabbau äußern.

Zunächst befaßten wir uns mit dem Stickstoffwechsel. Die Bakterien, die in auf pH 7,0 abgepufferter synthetischer Asparagin-Nährlösung gezogen wurden, setzten wir erst nach 40-stündiger Bebrütung einer Bestrahlung von 20 Stunden ($i = 3$) aus. 50 ml Bakteriensuspension enthielten je 1,25 mg Farbstoff, so daß die Versuchskonzentration 1 : 40 000 betrug. Nach 40- bis 60-stündiger Kulturzeit, wurden die Bakterien abzentrifugiert, getrocknet, eingewogen und nach der Kjeldahl-Mikromethode auf ihren Stickstoffgehalt untersucht. Der von den Bakterien aufgenommene Farbstoff wurde kolorimetrisch bestimmt. Der in den Fluorochromen vorhandene Stickstoff wurde vom Eiweißstickstoff abgezogen.

Wie aus den Unterschieden der Trockengewichte zu erwarten war, konnten beim Stickstoffgehalt des Bakterieneiweißes keine signifikanten Unterschiede den entsprechenden Trockengewichten von Hell- und Dunkelkulturen gegenüber beobachtet werden. Die photodynamischen Schäden verändern also nach unseren Versuchen den Gesamtstickstoffgehalt der Zelle nicht (Tabelle 1). Die Ergebnisse stimmten bei *E. coli*- und *Bac. subtilis*-Kulturen gut überein. Auch die drei Farbstoffe AO, TF, CP verhielten sich in ihrer Wirkung gleich.

Der Eiweißstoffwechsel wurde in drei verschiedenen Fraktionen untersucht. Die Anzucht der Mikroben erfolgte auf dieselbe Weise wie bei den Versuchen zur Stickstoffbestimmung. Als Kulturgefäße benutzen wir wiederum Liegekulturflaschen. Auch die Belichtungszeiten brachten wir mit denen der vorhergehenden Versuchsreihe in Einklang. Die chromatographische Trennung der Cytoplasma- und der freien, in das Nährmedium ausgeschiedenen Aminosäuren wurde eindimensional aufsteigend durchgeführt. Die Aminosäuren des Eiweißhydrolysats wurden zweidimensional chromatographisch getrennt. Als Lösungsmittelgemisch wählten wir hauptsächlich Butanol-Eisessig- H_2O und α -Picolin, als Entwickler-Reagenz für die einzelnen Aminosäuren diente Ninhydrin, das wesentlich empfindlicher wie Folins Reagenz wirkte. Da die einzelnen RF-Werte in den wenigsten Fällen mit denen der Literatur übereinstimmen, nahmen wir zur Identifizierung der Aminosäuren ein Gemisch häufig vorkommender Aminosäuren als Testsubstanzen. Verwendet wurden: Asparagin, Asparaginsäure, Cystein, Glutaminsäure,

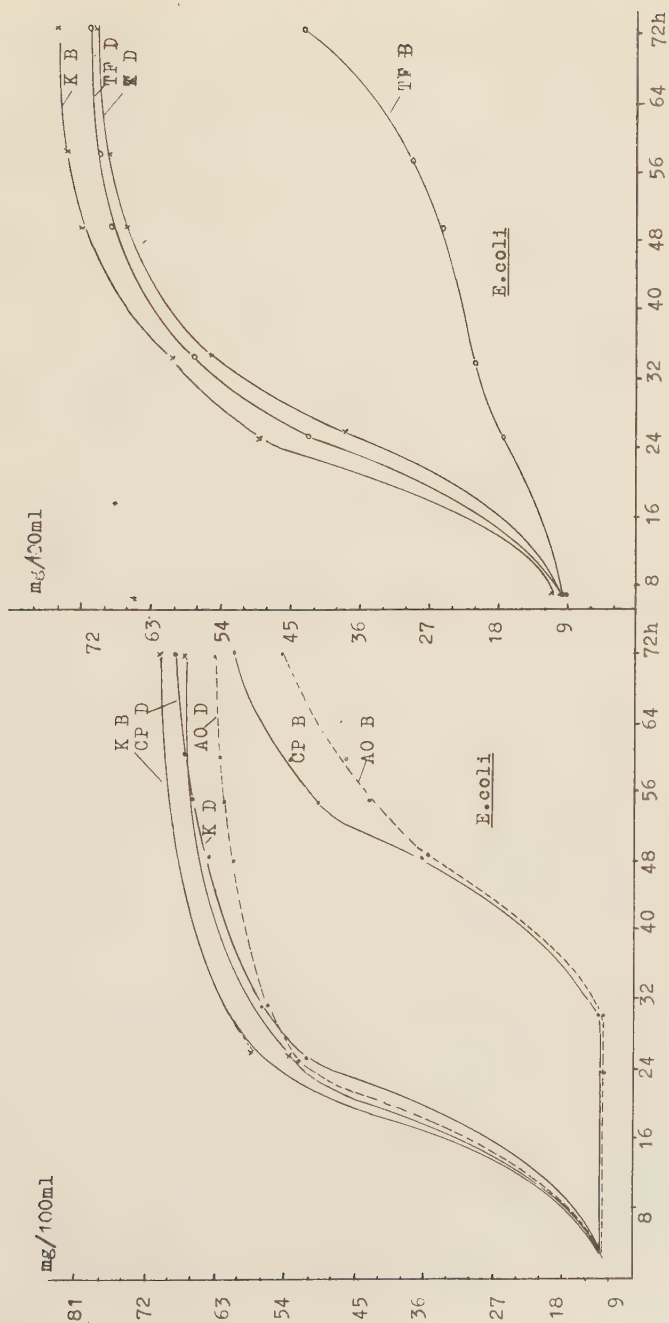


Abb. 9 : Wachstum von *E. coli* Farbstoffkonz. 1 : 100 000
Belichtung 60' **1 = 2**

K = Kontrolle
D = Dunkel
B = Belichtet

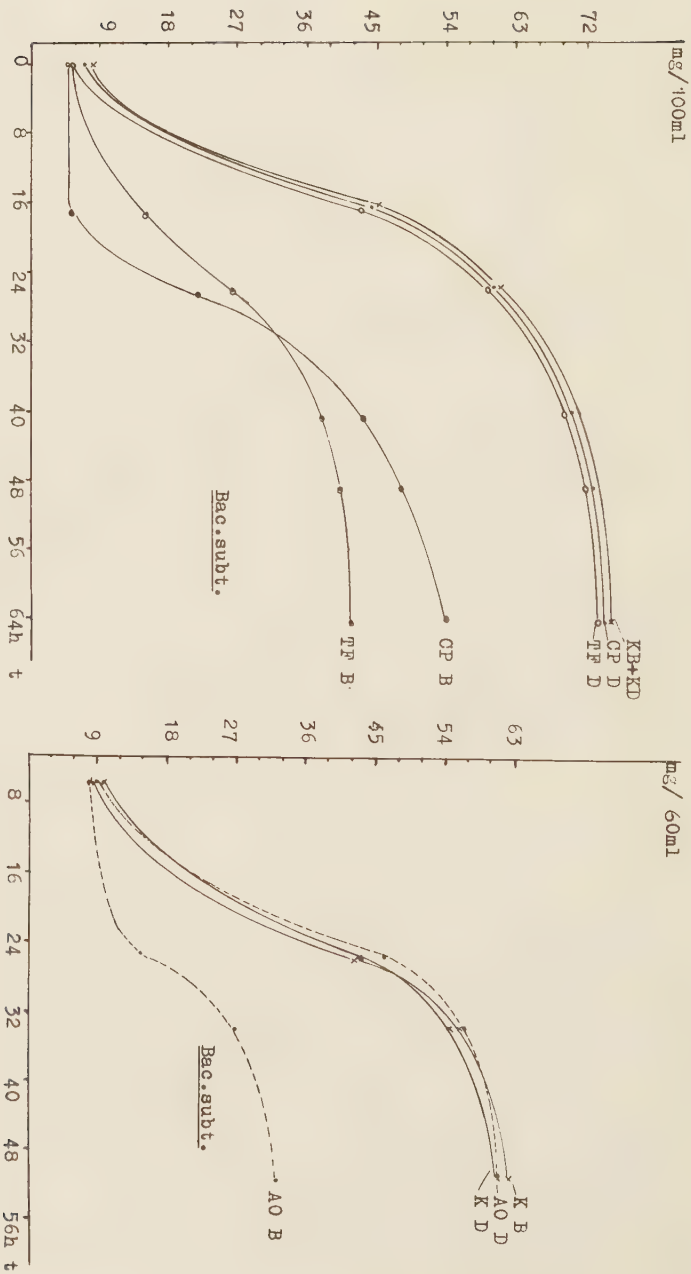


Abb. 10 : Wachstum von *Bac. subtilis* Farbstoffkonz. 1 : 100 000
Belichtung 65' 1 = 2

Glycin, Alanin, Leucin, Methionin, Serin, Threonin und Valin in einprozentiger Isopropanollösung.

Die Menge der in der Fraktion a vorhandenen Aminosäuren war sehr gering, lediglich in älteren Bakterienkulturen war die Zahl der ausgeschiedenen Aminosäuren höher. Hierbei handelte es sich wahrscheinlich um eine Autolysenerscheinung, die bei allen alternden Bakterienkulturen zu beobachten ist. Hell- und Dunkelkulturen zeigten keine Quantitäts- und Qualitätsunterschiede der identifizierten Aminosäuren. Allerdings war die Quantität der in die Nährlösung ausgeschiedenen Aminosäuren bei Kulturen mit Farbstoffzusatz wesentlich erhöht. BOGEN (1953), der ebenfalls ein aktives Ausscheiden von Cytoplasma-Aminosäuren bei mit AO behandelten Hefekulturen beschreibt, hält diesen Befund für eine durch den Farbstoff bewirkte Störung der Zellwandpermeabilität der Mikroorganismen. In unseren Versuchen konnten wir bei AO, CP, TF-Kulturen von *E. coli* und *Bac. subtilis*, sowohl in Hell- wie auch in Dunkelkulturen Asparagin, Asparaginsäure und Glutaminsäure im Substrat feststellen. Dabei ist einzufügen, daß bei ungefähr gleichem Bakterientrockengewicht die Menge vorgefundenen Asparagins in den Kulturen ohne Farbstoff nur in Spuren zu beobachten war, während die Farbstoffkulturen (hell und dunkel) eine so große Asparaginausscheidung zeigten, daß dieses nicht aus der Nährlösung allein stammen konnte.

Auch die aus dem Alkoholauszug der Fraktion b isolierten freien Cytoplasma-Aminosäuren wiesen in Qualität und Quantität bei photodynamisch geschädigten wie bei Dunkelkulturen keine Unterschiede auf. Vorauszuschicken ist, daß wir die schon durch das verschiedene Trockengewicht von Hell- und Dunkelkulturen gegebenen quantitativen Unterschiede berücksichtigten und die jeweilige Aminosäurenkonzentration auf das entsprechende Trockengewicht bezogen. Bei *E. coli* konnten wir durchschnittlich acht freie Cytoplasma-Aminosäuren feststellen, während es bei *Bac. subtilis* meistens zehn waren.

Das Hydrolysat des Rückstandes der Fraktion b ergab die dritte Fraktion c. Die chromatographische Trennung des Eiweißhydrolysats bestätigte sowohl qualitativ wie quantitativ die von KANDLER und ZEHENDER (1956) beschriebene Aminosäurekombination des Eiweißes von *E. coli* und *Bac. subtilis*. Auf einzelne Ninhydrin-positive Flecke, die wir nicht eindeutig identifizieren konnten, sei hier nicht näher eingegangen. Wir bestimmten in den einzelnen Versuchen die Aminosäuren in einer auf das Trockengewicht der Bakterien bezogenen Gesamtkonzentration von etwa 2,5 %. Unterschiede zwischen den verschiedenen Farbstoff-Kulturen, dunkler und photodynamisch geschädigter Kulturen waren in keinem Falle zu erkennen (Tabelle 2).

Stickstoffbestimmungen:

Bacillus subtilis

mg	AO		TF		CP		KD
	B	D	B	D	B	D	
Trockengew.	8,200	16,500	8,000	16,280	8,900	16,400	14,45
Farbst. aufn.	0,970	1,040	0,730	0,300	1,080	1,160	-
N gesamt	0,735	1,946	0,640	1,670	1,068	2,030	1,44
Farbst. N	0,172	0,184	0,117	0,048	0,158	0,160	-
N	0,563	1,762	0,523	1,622	0,910	1,870	
Trockengew. -Farbstoff	7,230	15,460	7,270	15,980	7,820	15,240	14,45

je 50 ml Suspension, 1,25 mg Farbstoff
 Kulturdauer 47 Std., Belichtung Blau 20 Std.
 (i = 3)

K = Kontrolle
 B = Bestrahlt
 D = Dunkel

Escherichia coli

mg	AO		TF		CP		KB
	B	D	B	D	B	D	
Trockengew.	7,400	16,800	11,000	17,800	10,680	20,700	22,25
Farbst. aufn.	1,080	1,170	1,090	1,400	1,040	1,080	-
N gesamt	0,670	1,842	0,700	1,330	0,737	1,727	2,29
Farbst. N	0,191	0,206	0,179	0,066	0,152	0,158	-
N	0,479	1,636	0,521	1,264	0,585	1,569	
Trockengew. -Farbstoff	6,310	15,630	9,910	16,400	9,640	19,620	22,25

je 50 ml Suspension, 1,25 mg Farbstoff
 Kulturdauer 45 Std., Belichtung Blau 20 Std.
 (i = 3)

K = Kontrolle
 B = Bestrahlt
 D = Dunkel

Stickstoffgehalt von

TF : 16,5 %
 AO : 17,7 %
 CP : ca. 14,7 %

Aminosäuren der Fraktion c

Aminosäuren	Bac. subtilis								E. coli							
	AOB	AOB	CPD	CPB	TFD	TFB	KD	KB	AOB	AOB	CPD	CPB	TFD	TFB	KD	KB
Isoleucin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Leucin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Alanin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glut. Säure	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Asp. Säure	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Valin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Serin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Prolin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Phen. alan.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Threonin	+	+	+	+	+	+	+	+	Sp	Sp	+	Sp	+	+	+	+
Arginin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrullin	+	+	+	+	Sp	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+
Lysin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cystin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Sp	+	+	-	+	+	-
Methion.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Tyrosin	Sp	Sp	Sp	Sp	Sp	+	Sp	+	+	+	+	+	Sp	+	+	+

Aminosäuren der Fraktion b

Leucin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Sp	+	Sp	+	+
Glycin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Serin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glut. Säure	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Alanin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Valin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Sp	+	+	+	+
Asp. Säure	+	+	+	+	+	+	+	+	Sp	-	-	-	-	-	-	-
Methion.	+	Sp	+	+	+	Sp	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Lysin	Sp	Sp	Sp	+	Sp	Sp	+	-	-	-	+	Sp	Sp	Sp	-	+
a-AminoBs	Sp	-	Sp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Aminosäuren der Fraktion a

Asp.	+	+	+	+	+	+	Sp	Sp	+	+	+	+	+	+	Sp	Sp
Asp. Säure	+	+	+	+	+	+	Sp	Sp	+	+	+	+	+	+	Sp	Sp
Glut. "	+	+	+	Sp	+	+	Sp	Sp	+	+	+	+	+	+	Sp	Sp

Tabelle 2 Sp = Spur

3. Untersuchung des Gaswechsels

Da nach unseren Untersuchungsergebnissen der Eiweiß- und Stickstoffwechsel nicht primär durch den von den drei Photosensibilisatoren erzeugten photodynamischen Effekt geschädigt werden, unterzogen wir den Gaswechsel der Bakterien einer genaueren Prüfung.

Wir verwendeten zur Suspension, um etwaige störende Einflüsse des normalerweise benutzten Asparagin-Nährmediums zu vermeiden, eine einprozentige Glucoselösung, die auf den jeweilig gewünschten pH-Bereich abgepuffert war. Zunächst bestimmten wir den Gaswechsel von AO-, CP-, TF-Kulturen im Dunklen und verglichen mit der Kontrolle ohne Farbstoff. Wie BOGEN (1955), der den Gaswechsel von Hefe mit Acridinorange-Zusatz beobachtete, konnten wir eine mehr oder weniger starke Hemmung der Bakterienatmung in den Farbstoffkulturen feststellen. Die Farbstoffkonzentration betrug in den Hauptversuchen wiederum 1 : 20 000. Die Atmungsintensität blieb in der Regel bei TF- und CP-Kulturen hinter der von AO-Kulturen zurück. Vermutlich verursachte auch hier das im Trypaflavin und Coriphosphin vorhandene Acriflavin, das schon seit langem als Zellgift bekannt ist, die stärkeren Hemmeffekte. Bei längerer Versuchsdauer konnte man eine langsame Adaptation der Bakterien an die drei Fluoreszenzfarbstoffe erkennen (Abb. 12). Geringere Farbstoffkonzentrationen (1 : 40 000 und 1 : 80 000) ergaben entsprechend abnehmende Dunkelgiftwirkung. Verdünnungen unter 1 : 160 000 zeigten nur bei TF-, CP-Kulturen noch schwache Hemmeffekte. - *Bac. subtilis* verhielt sich den Fluorochromen gegenüber empfindlicher, was in seiner etwas stärkeren Farbstoffspeicherung begründet sein kann (Abb. 11, 12).

In den entsprechenden Lichtversuchen wurden Suspensionen von *E. coli* und *Bac. subtilis* bei einer Farbstoffkonzentration von 1 : 20 000 einer 40minütigen Belichtung ($i = 1$) im Bereich des Absorptionsmaximum der drei Photosensibilisatoren ausgesetzt. Die Atmung der Bakteriensuspensionen, die nephelometrisch auf die gleiche Dichte wie die der vorausgegangenen Dunkelversuche gebracht wurden, maßen wir immer zwei bis drei Stunden lang vor der Bestrahlung im verdunkelten Gerät. Sofort nach Belichtungsbeginn setzte schlagartige Hemmung der Atmung ein. Nach ca. 40 - 50 Minuten wurde ein bleibender Minimalwert von 5 - 10 % erreicht; auch mehrere Stunden nach dem photodynamischen Schock konnten wir keine Erholungsreaktionen beobachten. Die photodynamisch bewirkte Gaswechselhemmung war bei *E. coli*- wie bei *Bac. subtilis*-Kulturen von gleicher Intensität. Überhaupt verhielten sich die beiden Bakterienstämme in diesen Versuchsreihen recht ähnlich. Auch die Atmungsschädigungen der verschiedenen Farbstoffkulturen untereinander wiesen keine ins Gewicht fallenden Unterschiede

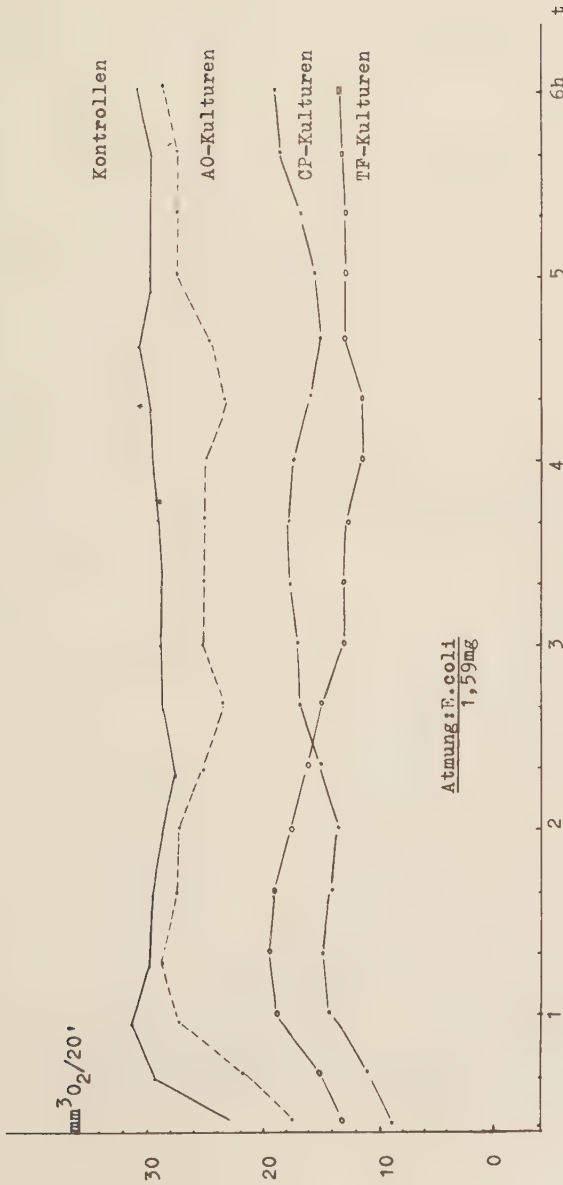


Abb. 11 : Farbstoffkonz. 1 : 20 000 Versuchst. + 26,9°C für alle nachfolgende
Schüttelfrequenz 120/Min WARBURG-Versuche gleich



Abb. 12 : Farbstoffkonz. 1 : 20 000

auf. Nur bei CP-Kulturen wurde der Atmungsminimalwert nach vorausgegangener Belichtung in einem kürzeren Zeitabschnitt erreicht. Die jeweils mitlaufenden Kontrollen ohne Farbstoffzusatz zeigten durch das Blaulicht keine Schädigung. Interessant ist die Tatsache, daß die Atmungshemmung bei regem Stoffwechsel, d. h. bei intensiver Atmung, besonders schroff und schnell auftrat (Abb. 13).

In einem weiteren Versuch wurde einer *Bac. subtilis*-Suspension vorbelichteter Farbstoff zugegeben (TF), da verschiedentlich in älteren Literaturangaben (zit. bei RAAB 1900) angeführt wird, daß die durch Belichtung entstehenden Zersetzungsprodukte giftig sind und dadurch den Stoffwechsel des Organismus hemmen. Allerdings konnte schon RAAB (1900), der vorbelichtetes Acridin Paramaecien zusetzte, diese Theorie widerlegen. Auch in unserem Falle konnten wir bei einer zehn Stunden ($i = 3$) lang vorbelichteten TF-Lösung keine Steigerung der toxischen Eigenschaften feststellen. Es ließ sich im Gegenteil eine etwas gesteigerte Atmungsintensität gegenüber der Farbstoff-Dunkelkontrolle gleicher Anfangskonzentration nachweisen. Dabei war durch die vorausgegangene Belichtung ein Gutteil des Farbstoffes zersetzt, wie bereits aus den Vorversuchen zu erwarten war. Überhaupt sind Photooxydationsprodukte von der Art $\text{Sens}^{\text{rad}} \cdot \text{O}_2$, also Peroxyde wohl so kurzlebig, daß sie unter gegebenen Umständen nicht gefaßt werden können (Abb. 14).

Anschließend setzten wir in Analogie zu den vorhergegangenen Dunkelversuchen Farbstoffverdünnungsreihen von 1 : 40 000, 1 : 80 000 und 1 : 160 000 an, um die Grenze der Farbstoffkonzentration, die noch photodynamisch auf die Atmung wirksam ist, zu ermitteln. In allen Fällen war bei Beginn der 40-minütigen Belichtung eine mehr oder weniger starke Atmungshemmung zu beobachten. Bei Konzentrationen des Farbstoffbades unterhalb von 1 : 80 000 wurde jedoch nur mehr 50 - 60 % der Atmung blockiert (Abb. 16, 17). Ebenfalls stellten wir hier erstmals eine Erholungsreaktion fest, d. h. ein langsames Ansteigen der Atmungsintensität kurz nach der maximalen photodynamischen Inaktivierung. Nach längerer Versuchsdauer wurden fast wieder die Werte der Ausgangsatmung erreicht (Abb. 15). Belichtungszeiten von einer Dauer von 20 Minuten ($i = 1$) ergaben eine Verringerung der photodynamischen Schäden bei allen Farbstoffkonzentrationen, doch selbst nach einer Bestrahlung von 30 Sekunden ($i = 1$) setzte noch deutlich meßbare Atmungshemmung ein (Abb. 17). Die untere Grenze der photodynamisch wirksamen Farbstoffkonzentration und die geringstwirksame Strahlendosis sollen in einem späteren Abschnitt erörtert werden.

Einfluß anderer Spektralfarben

Nach der Erkenntnis, daß es sich bei den photodynamischen Giftwirkungen primär um eine Atmungsschädigung unter Einfluß des absorbierenden Blaulichts handelt, arbeiteten wir mit Bestrahlungen benachbarter Wellenlängenbereiche, um zu prüfen, ob auch Licht außerhalb des Wellenlängenbereichs der Absorptionsmaxima der drei Fluorochrome wirksam sei. Hierzu verwendeten wir Philips-Leuchtstoffröhren der Farben Gelb und UV A, die ihr Strahlungsmaximum dicht neben den genannten drei Absorptionsmaxima der drei Farbstoffe haben. Wir nahmen in einem Versuch nacheinander die Bestrahlungen im gelben (λ_{max} 599 nm), im UV A (λ_{max} 325 nm) und im blauen (λ_{max} 425 nm) Bereich vor. Gelb- und UV A-Licht zeigten keine auf photodynamische Schäden beruhenden Hemmeffekte, während die Blaubelichtung den schon beschriebenen sofortigen Atmungsrückgang der Farbstoffkulturen zur Folge hatte. Die Kontrollen ohne Fluorochromzusatz blieben unbeeinflusst. *E. coli* und *Bac. subtilis* verhielten sich gleich. Ebenso zeigten die drei Photosensibilisatoren in ihrer Wirkung keine Unterschiede (Abb. 18).

Um den für eine photodynamische Reaktion notwendigen Luftsauerstoff auszuschalten, führten wir weitere Gaswechseluntersuchungen in Stickstoffatmosphäre, also unter anaeroben Verhältnissen durch. GRAFFI (1953), der die photodynamische Wirkung cancerogener Kohlenwasserstoffe untersuchte, konnte die Notwendigkeit molekularen Sauerstoffs bei dieser Reaktion nachweisen, da bei Sauerstoffausschluß keine photodynamischen Schäden auftraten. Für unsere Versuche im anaeroben Milieu zeigte sich *E. coli* als fakultativ anaerober Organismus besser geeignet als *Bact. subtilis*, der als obligat aerob bekannt ist. Die Bestimmung der Gärung wurde deshalb nur mit *E. coli*-Suspensionen durchgeführt. Zu diesem Zweck durchspülten wir Manometersystem und Bakteriensuspension kräftig mit gereinigtem Stickstoff. Die Konzentration der einzelnen Farbstofflösungen betrug wiederum 1 : 20 000. Zu jedem Versuch liefen entsprechende aerobe Kontrollen mit. Wie bei den Atmungsuntersuchungen wurde die CO_2 -Ausscheidung der Gärung über eine Stunde im verdunkelten Gerät gemessen. Nach einer anschließenden 40minütigen Bestrahlung ($i = 1$) im wirksamen "Blau" zeigte sich, daß die Gärung bei allen drei Farbstoffkulturen keine Intensitätsminderung erfuhr. Lediglich in TF-Kulturen blieb die Gärung von vorneherein durch die Dunkelgiftwirkung dieses Fluorochroms gering. Weniger beeinträchtigt verhielten sich dagegen die Bakterienkulturen, denen AO als Photosensibilisator zugegeben war. Der Gaswechsel der aeroben Kontrollen ging bei Belichtungsbeginn gleichzeitig spontan zurück.

Es konnte also in unseren Versuchen bestätigt werden, daß die photodynamisch



Abb. 13 : Farbstoffkonz. 1 : 20 000
Belichtung $f = 1$

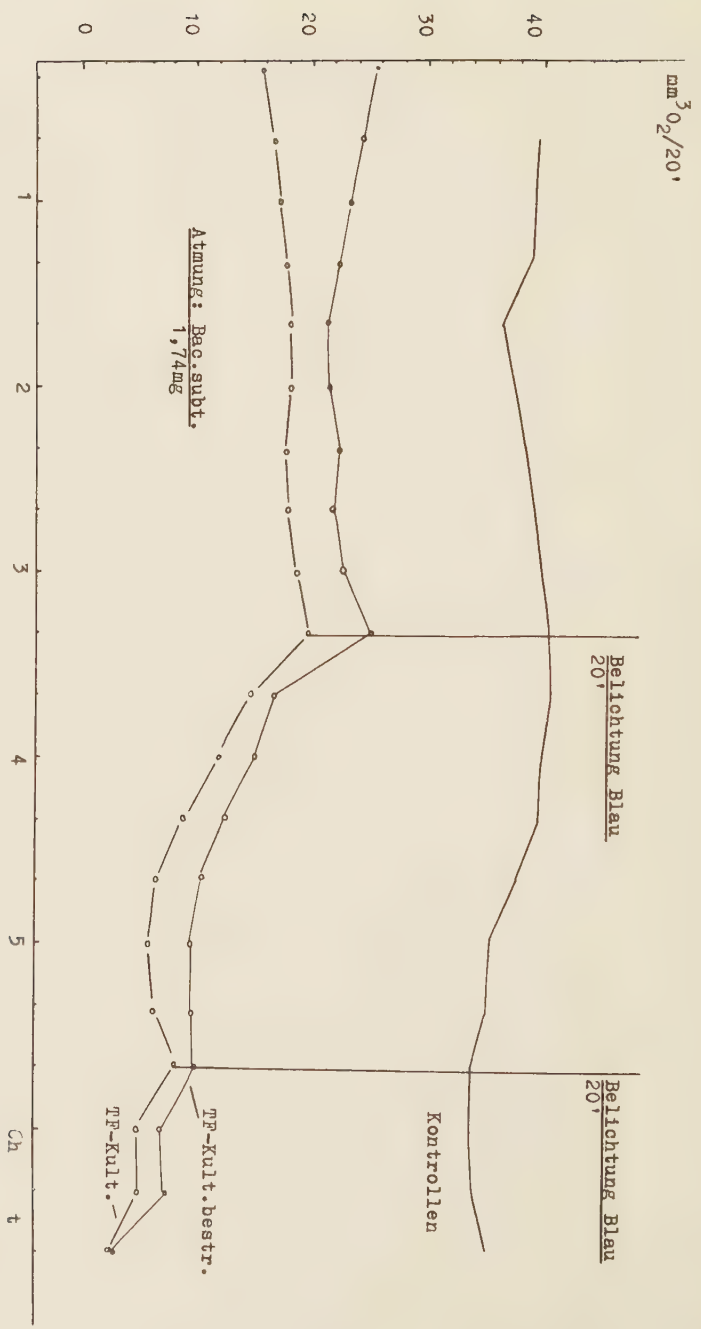


Abb. 14 : Farbstoffkonz. 1 : 20 000, TP bestrahlt 10 Std. $I = 2$
Belichtung $I = 1$

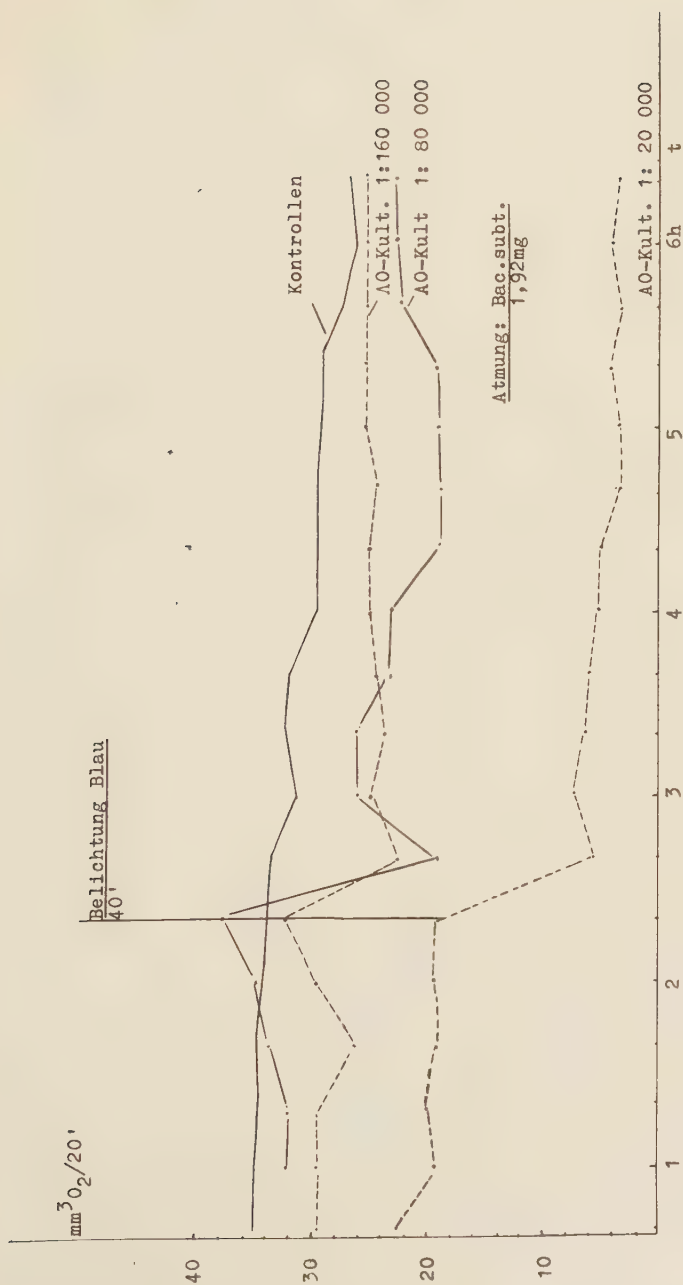


Abb. 15 : Belichtung $f = 1$

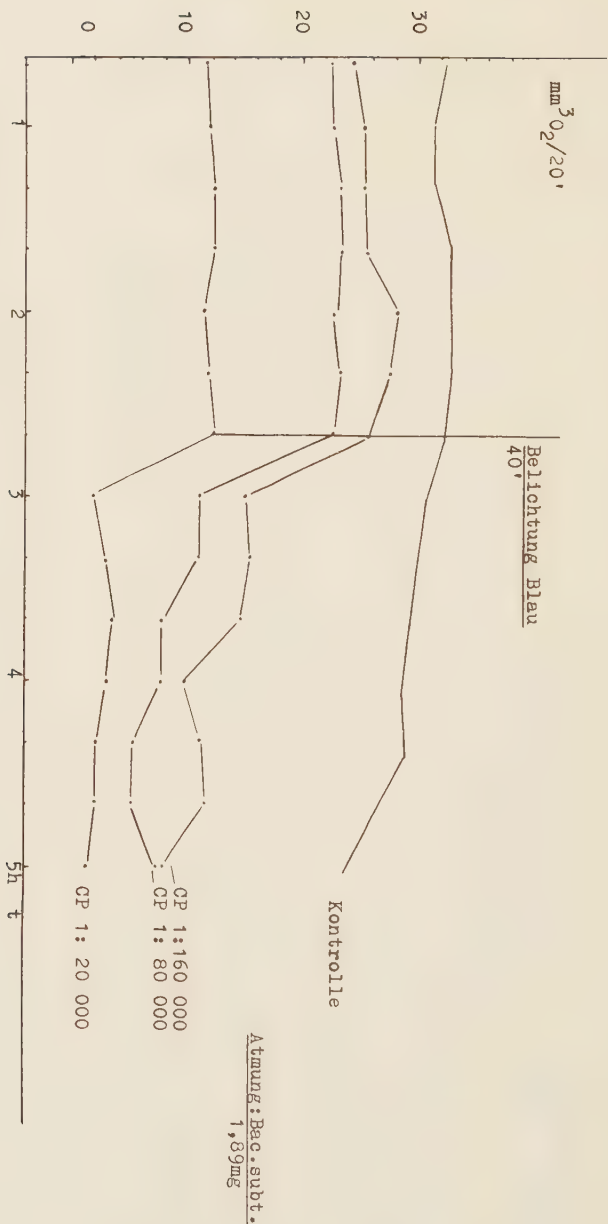


Abb. 16 : Belichtung $i = 1$

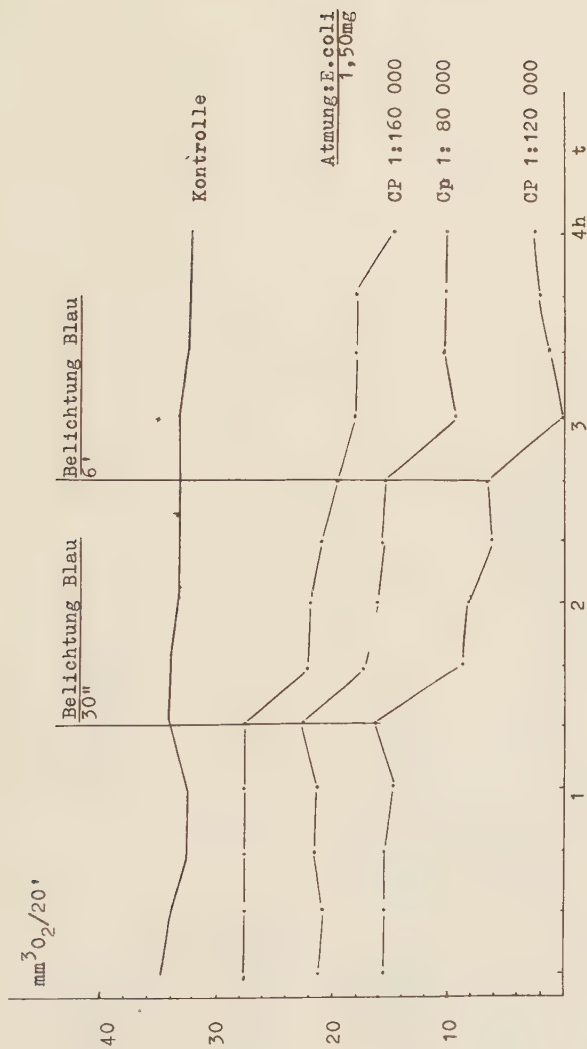


Abb. 17 : Belichtung i = 1

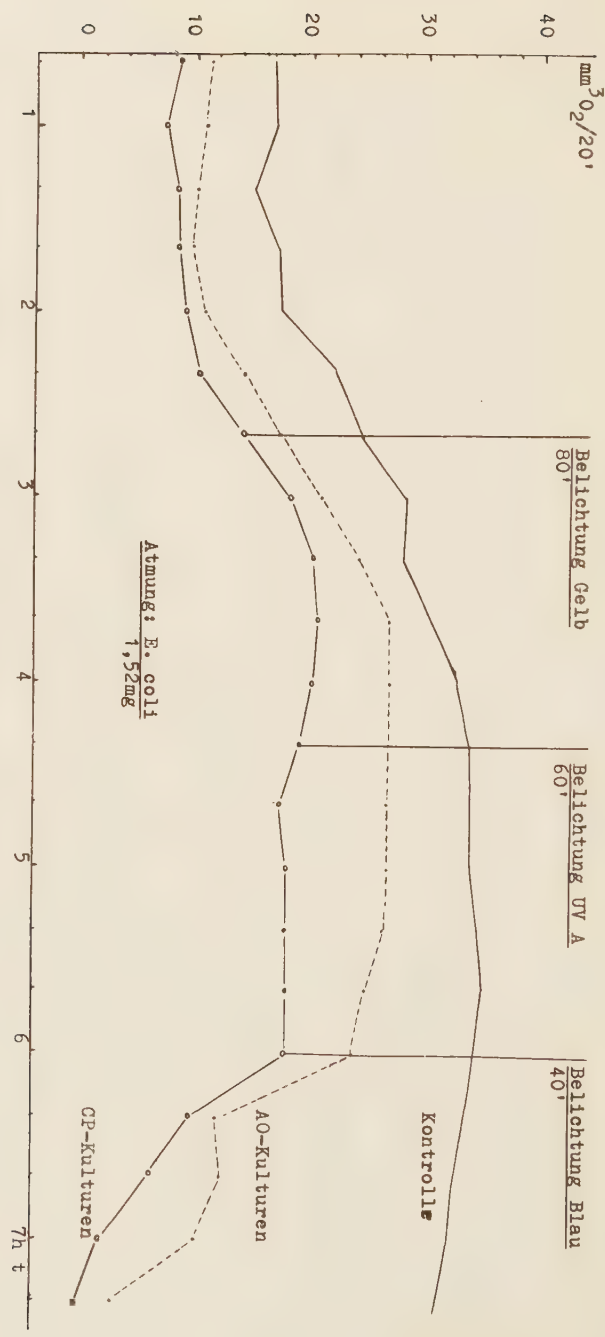


Abb. 18 : Farbstoffkonz. 1 : 20 000 Belichtung: Blau 1 = 1
 " " " 18
 UV A " " 1u



Abb. 19 : Farbstoffkonz. 1 : 20 000
Belichtung 1 = 1

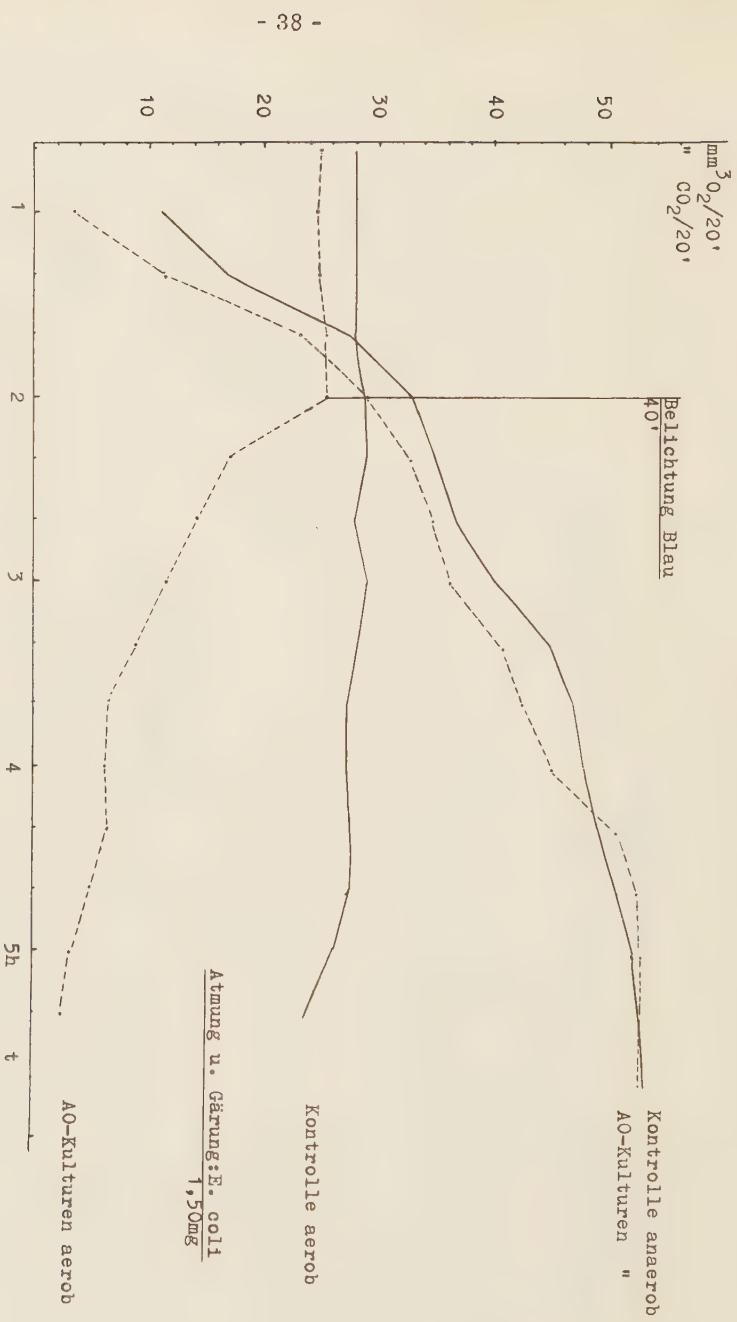
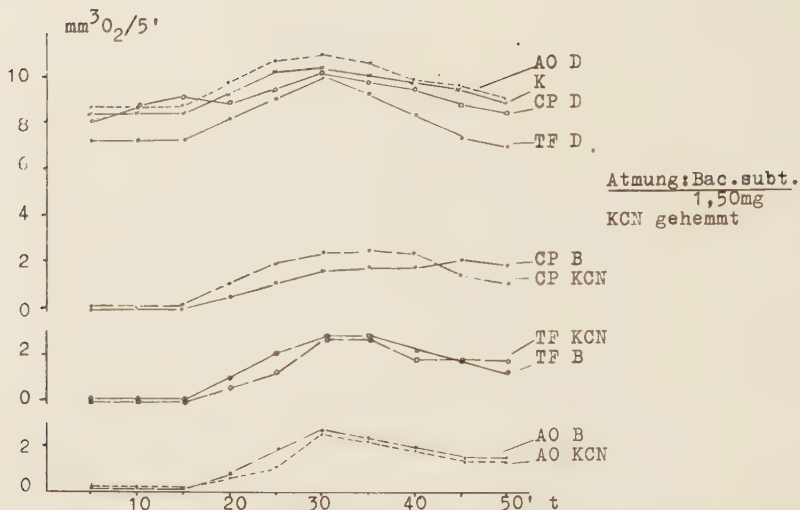


Abb. 20 : Farbstoffkonz. 1 : 20 000
Belichtung 1 = 1

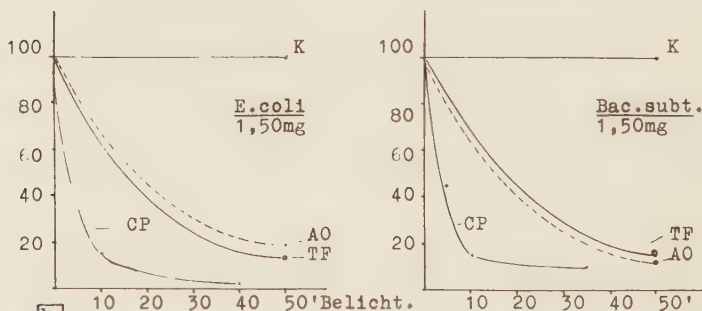
erzeugten Hemmeffekte auch bei Acridinderivaten nur bei Zugewesen von molekularen Luftsauerstoff auftreten können (Abb. 19, 20).

Bei den meisten Atmungsuntersuchungen verblieb bei der durch den photodynamischen Effekt bewirkten Atmungshemmung noch eine Restatmung, deren Betrag zwischen 2 und 12 % wechselte, übrig. Die Tatsache legt die Vermutung nahe, daß nicht alle Fermente der Atmungskette durch die photodynamische Giftwirkung blockiert werden, sondern daß Teile der Bakterienatmung, wenn auch im geringen Maße über andere Fermentsysteme laufen. Zu diesem Zweck hemmten wir in den Farbstoffdunkelkontrollen der *E. coli*- und *Bac. subtilis*-Suspensionen die Atmung mit einer starken Dosis von Kaliumcyanid (KCN : $2 \cdot 10^{-3}$ mol). Bekanntlich hemmt KCN die Atmung, indem es die Oxydation oder Reduktion des Cytochroms durch Bindung des Eisens in einem Cyanidkomplex blockiert. Dabei bleibt jedoch auch stets eine sehr geringe Restatmung bestehen, die von dem jeweiligen physiologischen Zustand des Organismus abhängig bald höher und niedriger sein mag. Man nimmt an, daß diese Restatmung über die Laktoflavinseite und die durch CN -Ionen nicht angreifbaren Cytochromkomponenten verläuft. Unsere Versuche ergaben (wenn die Suspensionsdichten der Bakterien, deren Alter und die Temperaturbedingungen stets gleichgehalten wurden), daß die bei maximaler photodynamischer Schädigung verbleibende Atmung ganz ähnliche Werte erreichte, wie die durch KCN -Hemmung erzielte Restatmung. Die auftretende Restatmung war bei *Bac. subtilis*-Kulturen etwas höher, als bei *E. coli*-Kulturen (Abb. 21a). Nach diesen Ergebnissen bestünde also durchaus die Möglichkeit, daß die von uns beobachtete Atmungshemmung vor allem durch eine Blockierung der eisenhaltigen Atmungsfermente zustandekommt.

Die gleichzeitig festgestellte Proportionalität der photodynamischen Schädigung zur angewandten Strahlendosis läßt sich am besten nachweisen, wenn man die Atmung vorher mit verschiedenen sich steigernden Energiemengen bestrahlter Farbstoffkulturen mit der von Dunkelkulturen gleicher Farbstoffmengen und Bakteriendichte vergleicht. Setzt man die von der Dunkelkontrolle aufgenommene Sauerstoffmenge gleich 100 % (= volle Atmungsintensität), so erhält man eine Exponentialkurve, die ein genaues Maß für die laufende Atmungsinaktivierung bei zunehmender Strahlendosis liefert. Bemerkenswert ist der steile Abfall der Atmungsaktivität zu Beginn. Die Aktivitätskurve nähert sich bei zunehmend höher eingestrahlt Energiemengen dem sich kaum mehr verändernden Wert der Restatmung (Abb. 21b).



a. KCN-Hemmung: mit $2 \cdot 10^{-3}$ mol KCN. Belichtung 45' $i = 2$
% vorhandene Atmung Farbstoffkonz. 1 : 20 000



b. % verbleibender Atmung $i = 2$

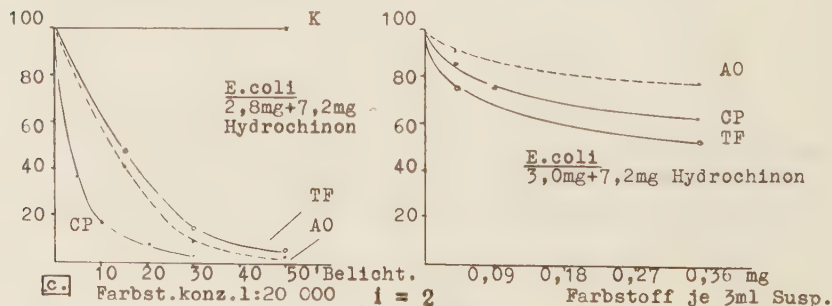


Abb. 21

d

4. Untersuchung von Fermentaktivitäten

Aus den bisherigen Versuchen wird ersichtlich, daß sich die photodynamische Giftwirkung primär in einer Atmungshemmung äußert. Es ist naheliegend anzunehmen, daß dementsprechend an der Atmung beteiligte Fermente eine Schädigung erleiden. Inwieweit auch andere Fermentkomplexe durch eine Photosensibilisierung inaktiviert werden, bleibt dabei offen. Schon TAPPEINER und JODLBAUER (1904) u. a. erbrachten den eindeutigen Nachweis, daß verschiedene Fermente bei Bestrahlung unter Verwendung bestimmter Photosensibilisatoren inaktiviert werden. In größerem Umfange unterzog GRAFFI (1953) verschiedene Fermente, namentlich Fermente des Atmungsstoffwechsels, die aus Rattenlebermitochondrien dargestellt waren, einer Untersuchung. Als Photosensibilisator verwendete GRAFFI den cancerogenen Kohlenwasserstoff Benzpyren. An fast allen von ihm getesteten Fermenten konnten ausgeprägte, auf photodynamische Giftwirkung zurückzuführende Inaktivierungen festgestellt werden.

Für unsere Versuche wählten wir nur Fermente, die sich an Bakterien schnell und in vivo untersuchen lassen. Zunächst prüften wir den Tricarbonsäurecyclus an der Aktivität der Succinodehydrogenase. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte nach dem Thunbergansatz mit Na-Succinat als Wasserstoffdonator und ausschließlich in vivo. Die Bakteriensuspensionen wurden nephelometrisch auf gleiche Dichte eingestellt, nach Eichkurve das entsprechende Trockengewicht ermittelt und auf einen pH-Bereich zwischen 7,1 und 7,3 abgepuffert. Die vorhergehenden Bestrahlungen nahmen wir in dünnwandigen Petrischalen vor und pipettierten dann die verschiedenen Bakterienmengen in Thunberggröhrchen ein, um den Fermenttest durchzuführen.

Die Entfärbungszeiten von Methylenblau als Maß der Aktivität der Succinodehydrogenase stimmten bei Suspensionen von *E. coli* und *Bac. subtilis* von konstanter Dichte mit Farbstoffzusatz der drei Fluorochrome im Dunkeln vollkommen mit den Kontrollen ohne Acridinderivate überein. Auch Konzentrationserhöhungen der drei Farbstoffe, die wir bis zu einer Menge von 1 : 10 000 auf die Bakterien einwirken ließen, blieben ohne schädigenden Einfluß auf die Aktivität der Succinodehydrogenase.

Bei Versuchen mit Lichtexpositionen im wirksamen Spektralbereich "Blau" zeigten sich nach einer bestimmten Strahlendosis schon ausgeprägte Inaktivierungen des Ferments. Sie waren bei Zugabe der drei verschiedenen Farbstoffe, sowohl bei *E. coli*- wie auch bei *Bac. subtilis*-Kulturen gleich stark und stimmten mit den an Lebermitochondrien gefundenen Ergebnissen von GRAFFI überein.

Auch bei Bakterienkulturen, die unter einer 24stündigen Dauerbestrahlung ($i = 2$) mit wirksamem Blau gezogen wurden und schon deutliche Adaptationserscheinungen zeigten, konnten wir noch starke Aktivitätsminderung der Dehydrogenase beobachten.

Um die Abhängigkeit der Fermentschädigung von der verabreichten Strahlendosis zu ermitteln, belichteten wir die Bakteriensuspensionen mit verschiedenen, laufend gesteigerten Strahlenmengen. Dabei wurde die Entfärbungszeit der jeweiligen Dunkeikontrolle gleich 100 % (= volle Aktivität) gesetzt, während bei den durch die photodynamische Giftwirkung geschädigten Kulturen die noch vorhandene Fermentaktivität sich - aus den verlängerten Entfärbungszeiten ergebend - in Prozenten errechnete. Wir konnten analog zu den Gaswechselversuchen eine Proportionalität der Fermentinaktivierung zur eingestrahnten Lichtenergie und Dauer feststellen. Auch hier erhielten wir eine Exponentialkurve mit starkem anfänglichem Abfall. Ebenso wie bei den Atmungsuntersuchungen zeigte sich Coriphosphin bedeutend früher, also bei geringeren Strahlendosen, photodynamisch wirksam als Acridinorange oder Trypaflavin. Während bei CP-Kulturen die Dehydrogenaseaktivität durchschnittlich schon bei einer Bestrahlung von 20 - 25 Minuten ($i = 2$) eine Inaktivierung bis 95 % erfuhr, trat dieselbe Schädigung bei AO- und TF-Kulturen erst nach Anwendung einer Belichtungsdauer von 40 - 45 Minuten ($i = 2$) auf. *E. coli* und *Bac. subtilis* zeigten auch hier durchaus dasselbe Verhalten. Kontrollen ohne Farbstoffzusätze wiesen keine oder meist nur unwesentliche Aktivitätsminderung bei gleichgehaltenen Belichtungszeiten auf (Abb. 22a, b).

Interessant ist, daß die Aktivität der Succinodehydrogenase in verhältnismäßig dünnen Bakteriensuspensionen von *E. coli* und *Bac. subtilis* schon bei geringsten Lichtmengen stark abnimmt. In diesem Falle bewirkt wohl mehr das bessere Durchdringungsvermögen der wirksamen Strahlen durch die dünnere Bakterienaufschlammung (weniger die geringere Fermentkonzentration) die starke Schädigung des Ferments (Abb. 22e, f).

In Ergänzung zu den Gaswechseluntersuchungen unterzogen wir die Wirksamkeit des photodynamischen Effekts in Farbstoffverdünnungsreihen einer eingehenden Prüfung: Die Farbstoffkonzentrationen wurden bis zu eins zu mehreren Millionen herabgesetzt. Bei allen Verdünnungsstufen konnten wir noch eine eindeutige Inaktivierung der Succinodehydrogenase beobachten. Selbst bei Fluorochromkonzentrationen von $73 \cdot 10^{-6}$ mg/4 ml Suspension stellten wir bei größeren Strahlendosen noch gut erkennbare photodynamisch bedingte Inaktivierung des Ferments fest. In allen Versuchen stellten wir die Bakteriendichte nephelometrisch etwa gleich ein. Die drei Farbstoffe verhielten sich in ihren photody-

namischen Wirkungen auch bei den geringsten Konzentrationen ähnlich. Coriophosphin zeigte bereits wiederum nach 20 - 25minütiger Bestrahlung die maximale photodynamische Wirksamkeit (Abb. 22c, d, 23a, b, c, d, e).

Anschließend führten wir eine Versuchsreihe unter anaeroben Verhältnissen durch, indem wir farbstoffvorbehandelte Bakteriensuspensionen vor der Belichtung und dem Thunbergansatz mit gereinigtem Stickstoff mehrere Minuten kräftig durchspülten. In Analogie zu den Gärungsversuchen mit *E. coli* behielt die Succinodehydrogenase bei O_2 -Abschluß auch bei Einstrahlung großer Lichtmengen ihre volle (oder nur geringfügig verminderte) Aktivität bei. Auch GRAFFI (1953) konnte nachweisen, daß unter anaeroben Verhältnissen bei Fermenten keine photodynamischen Schäden auftreten. Die Succinodehydrogenase der beiden Bakterienstämme zeigte bei Zugewegsein der drei Fluorochrome in dieser Hinsicht keinerlei Unterschiede (Abb. 22a, b, 23b).

Um die Rolle des molekularen Sauerstoffs, der nach dem Schenk'schen Übertragungsschema aktiviert wird, zu überprüfen, führten wir die Aktivitätsbestimmung der Succinodehydrogenase analog zu den Versuchen mit den Farbstoffen allein mit den uns bekannten Sauerstoffakzeptoren durch. Dabei muß bemerkt werden, daß die Sauerstoffakzeptoren (Hydrochinon, Pyrogallol, Cystein und Ascorbinsäure) ohne Bakterienzusatz mit dem Methylenblau keine Reaktion zeigten. Hydrochinon in einprozentiger Lösung den zu bestrahlenden Farbstoffkulturen beigegeben, brachte auch hier infolge der geringen Affinität dem vom Sensibilisator übertragenen Sauerstoff gegenüber kein befriedigendes Ergebnis. Zu erwähnen ist außerdem noch die Fähigkeit des Hydrochinons, die Bakterienatmung teilweise zu entkoppeln. Die photodynamisch bedingte Fermentinaktivierung trat unvermindert weiter auf. Im nächsten Versuch verwendeten wir Pyrogallol als Sauerstoffakzeptor. Wie in den Vorversuchen erwies sich dieses Phenolderivat als gut geeignet; allerdings traten wiederum Störeffekte durch das sich bildende Purpurogallin auf, so daß dadurch nur mit abgeschwächten Strahlendosen gearbeitet werden konnte. Trypaflavin verursachte jedoch auch mit geringsten Lichtmengen eine rege Reaktion mit Pyrogallol, so daß in diesen Versuchen keine zulässigen Ergebnisse erhalten werden konnten. Belichteten wir nun die Bakteriensuspensionen (die Farbstoffkonzentration betrug 1 : 20 000) mit Zusatz einer einprozentigen Pyrogallollösung pH 7,0 im wirksamen Spektralbereich "Blau", so wurden die photodynamisch verursachten Dehydrogenaseinaktivierungen bei CP- und AO-Kulturen deutlich vermindert. In vielen Fällen waren nach der maximalen Belichtungszeit von 45 Minuten ($i = 2$), in der unter normalen Verhältnissen die geringste Fermentaktivität verzeichnet wurde, bei Pyrogallolzusatz noch 60 und mehr Prozent Aktivität vorhanden.

Mit einzuberechnen ist jedoch noch die relativ große Giftigkeit des Pyrogallols für die Bakterien, die auch in ungefärbten Kulturen im Dunklen eine wesentliche Aktivitätsminderung der Succinodehydrogenase mit sich bringt. In diesem Fall wurden die Entfärbungszeiten des Methylenblaus dieser dunklen Kulturen mit Pyrogallolzusatz der vollen Aktivität (= 100 %) gleichgesetzt. Inwieweit die Aktivitätsminderung des Ferments, die nach längerer Belichtungszeit bei Zugewesen von Pyrogallol dennoch auftrat, auf stärker werdende Giftigkeit des entstehenden Purpurogallins oder auf die photodynamische Wirkung zurückzuführen ist, konnten wir nicht entscheiden (Abb. 22a, b, 23b).

Im weiteren Verlauf führten wir die Versuche zur Aktivitätsbestimmung der Dehydrogenase noch mit Cystein- und Ascorbinsäurezusatz durch. Wie bekannt, stellen Cystein und Ascorbinsäure durch die Bildung von Cystin und Dehydroascorbinsäure spezielle Redoxsysteme dar und eignen sich gut als Sauerstoff-Akzeptoren. Bei pH-Werten > 5 , d. h. bei neutralem bis alkalischem Bereich wird die Dehydroascorbinsäure leicht weiter oxydiert, wobei die C-Kette zerfällt. Cystein und Ascorbinsäure haben gegenüber den Phenolderivaten den Vorteil, daß bei einer Oxydation keine gefärbten und giftigen Oxydationsprodukte entstehen. Cystein, das zu je 10 mg den zu bestrahlenden Bakteriensuspensionen beigegeben wurde, konnte bei AO- und CP-Kulturen keine durchgehende größere Schutzwirkung vor dem photodynamischen Effekt entfalten, da es augenscheinlich kaum durch den aktivierten Sauerstoff aufoxydiert wurde (Abb. 22c, 23d, f). Bei TF-Kulturen allerdings erzeugte ein Cysteinzusatz vor der wirksamen Blaubestrahlung eine deutliche Verminderung der lichtbedingten Dehydrogenaseninaktivierung (Abb. 22d, 23f). Fast in allen Fällen konnte bei einer maximalen Strahlendosis noch etwa 80 % Fermentaktivität festgestellt werden. Wenn wir jedoch die gefärbten Bakteriensuspensionen vor der Bestrahlung je 10 mg Ascorbinsäure (pH 7, 2) als Sauerstoffakzeptor beigaben, konnten wir keine Inaktivierungsminderung des Ferments beobachten, d. h. die Ascorbinsäure blieb wirkungslos.

In einer weiteren Versuchsreihe bestimmten wir nochmals die Atmung der Bakterien von AO-, CP- und TF-Kulturen. Nun gaben wir aber Hydrochinon als atmungsentkoppelnde Substanz zu.

In der neuen Literatur finden sich Angaben, die von einer weitgehenden Atmungsentkoppelung, besonders der oxydativen Phosphorylierung durch Phenol-derivate sprechen. In dieser Hinsicht ist vor allem das DNP (2, 4-Dinitrophenol) bekannt geworden. Inwieweit Hydrochinon die normale Zellatmung ganz oder nur teilweise ersetzt, ist noch nicht bekannt. Wir gaben es in einer großen

zu Abb. 22

Aktivitätsbestimmung der Succinodehydrogenase

- a, b : Farbstoffkonz. 1 : 20 000, Belichtung $i = 2$
je 2 ml Pyrogallol (1 %ig) auf 3 ml Suspension
- c : mg Acridinorange auf 3 ml Suspension, je 10 mg
Cystein, Belichtung $i = 2$
- d : mg Trypaflavin auf 3 ml Suspension, je 10 mg
Cystein, Belichtung $i = 2$
- e, f : Farbstoffkonz. 1 : 20 000, Belichtung $i = 2$

zu Abb. 23

Aktivitätsbestimmung der Succinodehydrogenase

- a : mg Acridinorange auf 3 ml Suspension,
Belichtung $i = 2$
- b : mg Acridinorange auf 3 ml Suspension,
Belichtung $i = 2$, AO Pyr. = 2 mg Pyrogallol (1 %ig)
auf 3 ml Suspension, AO Pyr. u. AO N₂ Farbstoffkonz. 1 : 20 000
- c : mg Trypaflavin auf 3 ml Suspension,
Belichtung $i = 2$
- d : mg Coriphosphin auf 3 ml Suspension, Belichtung
 $i = 2$, je 10 mg Cystein auf 3 ml Suspension
- e : mg Coriphosphin auf 3 ml Suspension, Belichtung
 $i = 2$
- f : Farbstoffkonz. 1 : 20 000, Belichtung $i = 2$,
je 10 mg Cystein auf 3 ml Suspension

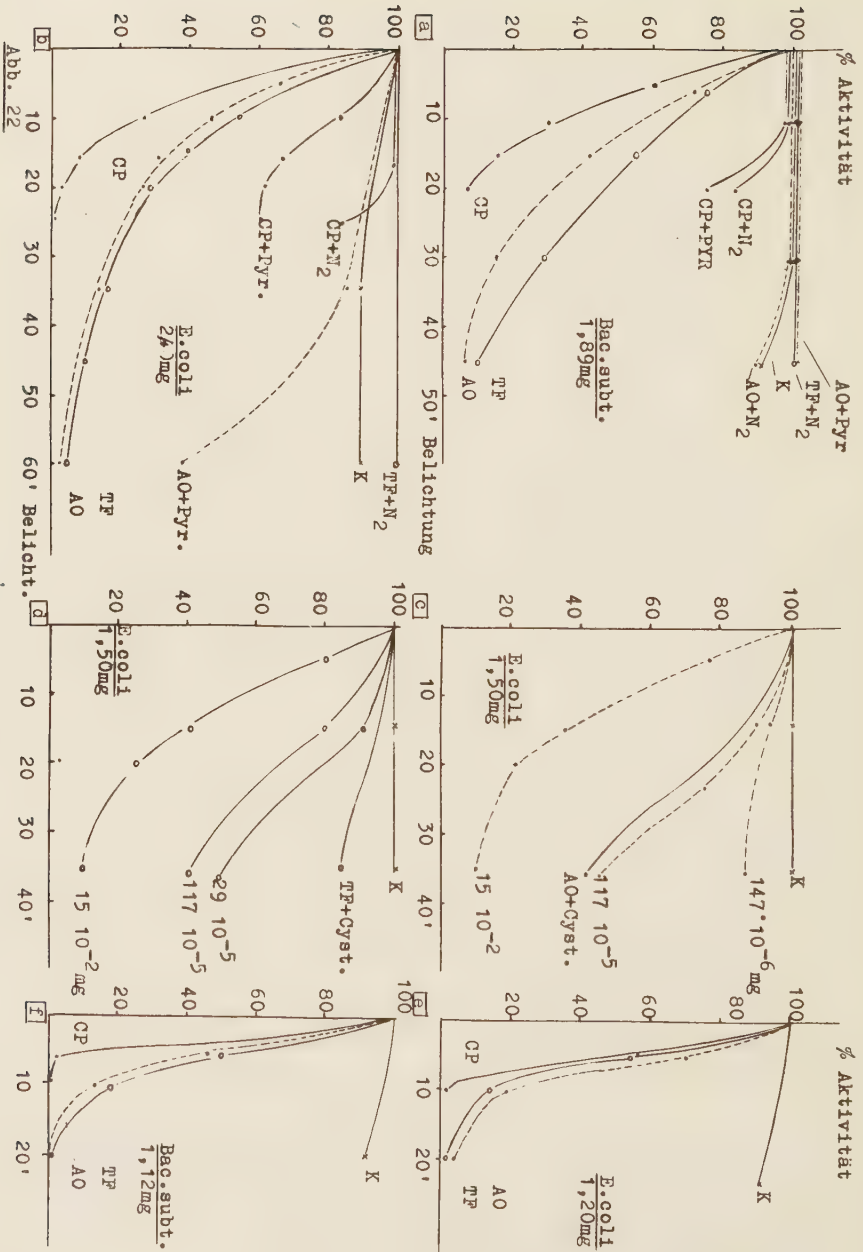
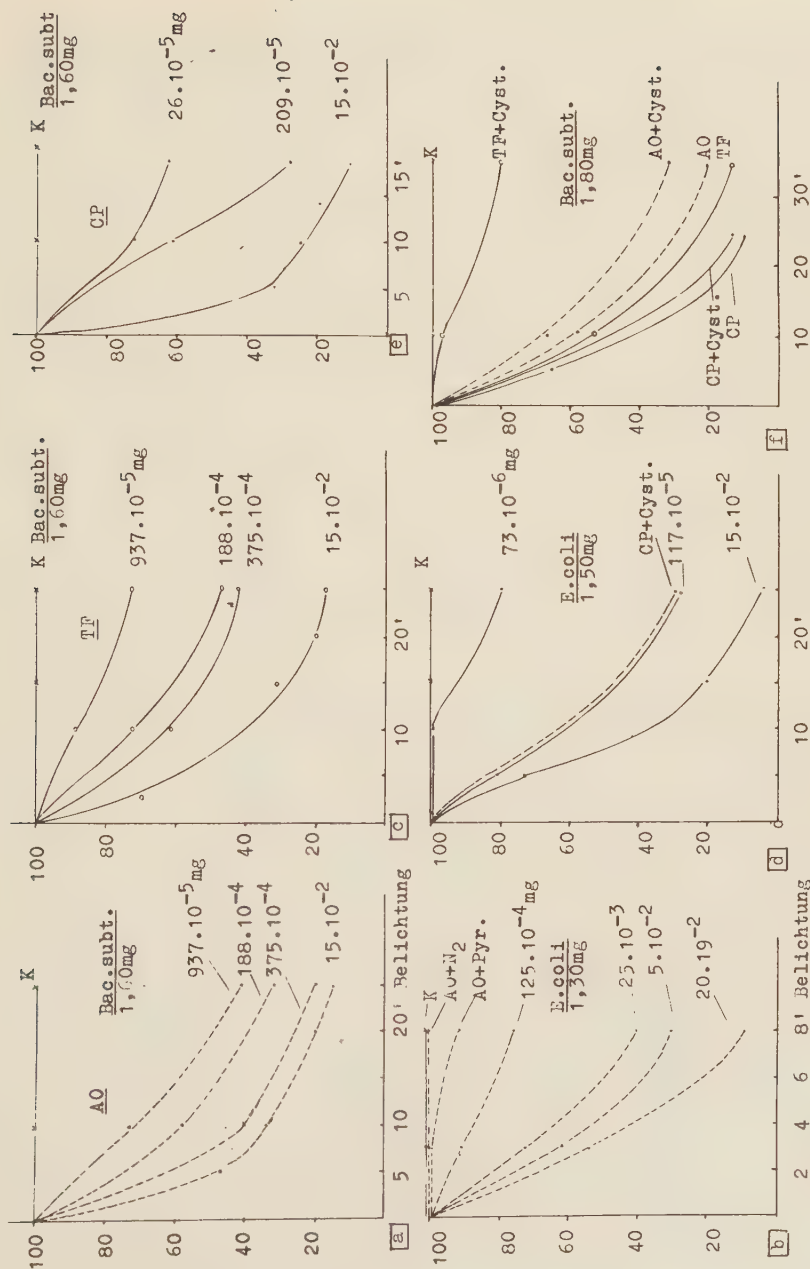


Abb. 22

% Aktivität



2 4 6 8' Belichtung

Abb. 23

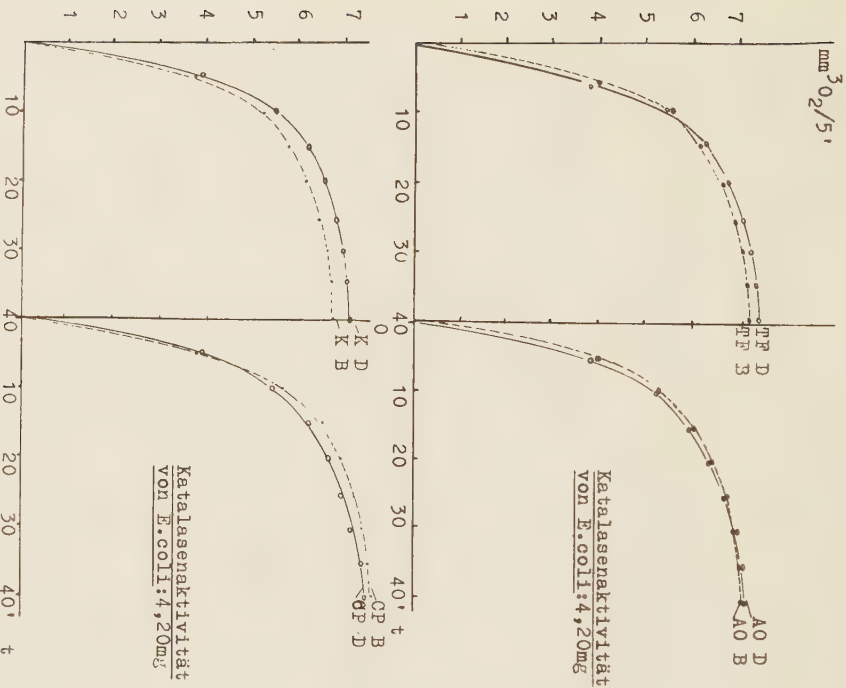
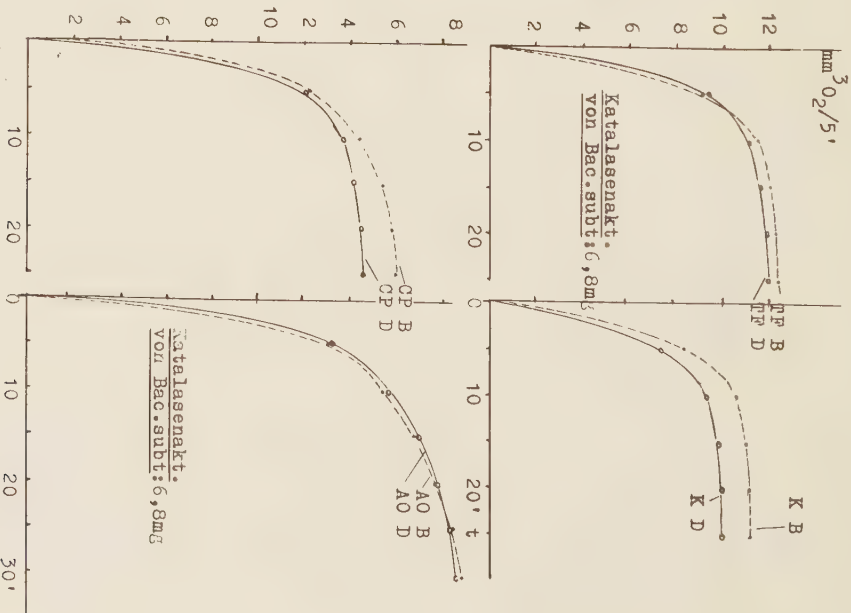


Abb. 24 Belichtung
50' i = 2



als Substrat 2 ml H_2O_2
Farbstf.konz. 1:20 000

Überdosis den Bakterien zu, und zwar auf 2 mg Bakterien Trockensubstanz je 7,5 mg Hydrochinon. In allen Fällen erhielten wir typische Kurven (aus den Atmungswerten) mit einem deutlichen Maximum und folgendem Abfall. Das Maximum der "Hydrochinonatmung" lag stets ein wenig höher als die Werte der normalen nicht entkoppelten Zellatmung. Steigende Lichtdosen brachten bei Farbstoffkulturen genau mit den Dehydrogenasenaktivität übereinstimmende Prozentsätze der photodynamisch verursachten Hemmung dieser "Hydrochinonatmung" (Abb. 21c). CP-Kulturen zeigten wiederum nach geringeren Strahldosen als TF- und AO-Kulturen die maximale Atmungshemmung. Der beobachtete Abfall der "Hydrochinonatmung" nach dem vorausgegangenen Maximum könnte auf ein giftiges Photooxydationsprodukt des Hydrochinons, auf das p-Chinon zurückzuführen sein. In Dunkelversuchen ergaben gesteigerte Farbstoffkonzentrationen der drei Fluorochrome eine langsam abnehmende Intensität der "Hydrochinonatmung" (Abb. 21d).

Es liegt nahe, anzunehmen, daß die Cytochromoxydase in demselben Maße geschädigt wird wie die Succinodehydrogenase, da beide Fermente miteinander vergesellschaftet auftreten. Dabei kann vorerst auf Grund der bisher geschilderten Versuche noch nicht geklärt werden, welche der beiden Fermentseiten, die oxydative oder die reduzierende zuerst blockiert wird und wie weit beide beeinflußt werden.

Als nächstes Ferment, das ebenfalls zu den eisenhaltigen Enzymen des Atmungsstoffwechsels zu zählen ist und sich durch eine außerordentlich starke Aktivität bei Mikroorganismen, insbesondere den aeroben, auszeichnet, untersuchten wir die Katalase. Man nahm früher an, daß die photodynamische Giftwirkung verschiedener fluoreszierender Farbstoffe speziell auf die Entstehung von Wasserstoffperoxyd zurückzuführen sei. Da aber Wasserstoffperoxyd in der Zelle durch die vorhandene Katalase spontan in Wasser und Sauerstoff zerlegt wird, könnte demnach eine Wasserstoffperoxydanreicherung nur durch primäre Schädigung dieses Fermentkomplexes in der Zelle entstehen und dadurch Vergiftungserscheinungen hervorrufen. SCARASCIA VENEZIAN (1952), der die Katalasenaktivität in Tabakblättern, die mit Acridinorange behandelt waren, prüfte, konnte eine Verminderung der Fermentaktivität feststellen. GRAFFI (1953) hingegen fand bei seinen Untersuchungen an der Katalase (aus Rattenlebermitochondrien) gerade die geringsten oder überhaupt keine Schädigungen durch eine mit Benzpyren photosensibilisierte Bestrahlung.

Wir bestimmten die Katalasenaktivität sowohl in vitro, wie in vivo, wobei sich letztgenannte Versuche schneller und genauer durchführen ließen. Zum mechanischen Zerkleinern der Bakterienzelle waren nämlich Al_2O_3 wegen

seiner adsorbierenden Eigenschaften, Seesand dagegen wegen der zu geringen Wirksamkeit (mangelnde Zerkleinerung der Bakterienzelle) nicht besonders geeignet. Bei den Versuchen wurden die Bestimmungen ausschließlich gasometrisch an der lebenden Zelle vollzogen. Die Bakteriensuspensionen von *E. coli* und *Bac. subtilis* wurden nephelometrisch auf gleiche Dichte gebracht, die Bestrahlung in Petrischalen vorgenommen. Die Farbstoffkonzentration betrug dabei wiederum 1 : 20 000. Da bekannt ist, daß eine Reihe von Fermenten, auch die Katalase, bei einer Belichtung mit energiereichen Strahlen starke Aktivitätsminderungen erfahren, nahmen wir in Kontrollversuchen zunächst Suspensionen von *E. coli* und *Bac. subtilis* ohne Farbstoffzusatz und belichteten sie mit einer hohen Strahlendosis (24 Stunden $i = 3$). Es zeigte sich, daß in den belichteten Kulturen die Katalase nur sehr gering in ihrer Aktivität beeinträchtigt wurde. Bei *Bac. subtilis* fielen die Schädigungen kaum ins Gewicht. Lediglich in Versuchen, bei denen die Bakterienkulturen einer Dauerbelichtung von 20 Stunden ($i = 3$) ausgesetzt waren, beobachteten wir bei der Katalase sowohl *in vitro* wie *in vivo* eine deutliche Aktivitätsminderung, die in den Farbstoffkulturen und Kontrollen gleich war und so nicht auf eine photodynamische Wirkung, verursacht durch die drei Fluorochrome, zurückzuführen war. Versahren wir nun die Suspensionen mit Farbstoffzusatz und setzten sie einer Belichtung im wirksamen "Blau" aus, die in ihrer Energiemenge den Dehydrogenasenversuchen angeglichen war, und bestimmten sofort danach die Katalasenaktivität, so konnten wir in keinem Versuch photodynamisch bedingte Aktivitätsverluste feststellen. In jedem Falle blieb die Fermentaktivität bei Hell- und Dunkel-Kulturen ohne signifikante Unterschiede bei allen Farbstoffzusätzen gleich. Die Suspensionen von *Bac. subtilis* wiesen gegenüber *E. coli*-Kulturen eine größere Katalasenaktivität auf (erklärlich, da *Bac. subtilis* streng aerob ist) (Abb. 24).

Da aus den bisherigen Versuchen ersichtlich wird, daß durch den photodynamischen Effekt wahrscheinlich zuerst jene Atmungsfermente inaktiviert werden, die die Fähigkeit haben, zwischen zwei- und dreiwertigem Eisen zu oszillieren, könnte die relative Resistenz der Katalase gegenüber photosensibilisierter Giftwirkung in der Besonderheit ihrer Wirkungsweise zu finden sein. Gerade neuere Untersuchungen, hauptsächlich von TREORELL und Br. CHANCE (zit. bei LEUTHARDT S. 235) (1947/48) haben gezeigt, daß der der Katalasen- und Peroxydasenwirkung zugrundeliegende Mechanismus im Gegensatz zu den Cytochromen nicht auf einem Valenzwechsel des Eisens beruht. Hier bleibt das Eisen vielmehr dreiwertig und könnte auf diese Weise valenzändernden Eingriffen entzogen sein.

Bei der photodynamischen Schädigung kann unter Umständen die Struktur des Eiweißträgers eines Fermentes verändert werden und somit ebenfalls eine Inaktivierung eintreten. Deshalb prüften wir anschließend probeweise die Aktivität der Glutaminsäure-Oxalessigsäure Transaminase, ein leicht zugängliches Ferment, das nicht unmittelbar am Atmungsmechanismus beteiligt ist. Bei allen Versuchen, die wir an beiden Bakterienstämmen unter Zusatz der drei Fluorochrome bei Belichtung und im Dunklen anstellten, konnten wir keine ins Gewicht fallenden Unterschiede hinsichtlich der Transaminasenaktivität beobachten (vgl. folgende Tabellen).

Versuchsansatz: 0,5 ml 0,10 M α -Ketoglutarinsäure, 1,0 ml
0,50 M L-Asparaginsäure, 0,5 ml Anilincitrat,
0,4 ml Fermentextrakt. pH 7,2

Farbstoffkonzentration 1 : 20 000, Belichtung 45' (i = 2)

Bestimmung des aus der Oxalessigsäure ausgeschied. CO_2 (manometrisch).
Fermenttest in vitro.

E. coli

mm³ CO_2

Zeit	AO		CP		TF		K	
	B	D	B	D	B	D	B	D
3'	21,50	25,60	25,60	24,30	27,04	25,60	25,60	28,30
3'	2,85	1,43	1,43	0,00	0,00	1,43	1,45	0,00

Bakterientrockengewicht: AO-Kultur : 4,5 mg, davon Fermentextrakt
CP " 5,3 " "
TF " 5,3 " "
Kontrolle : 5,3 " "

Bac. subtilis

mm³ CO_2

Zeit	AO		CP		TF		K	
	B	D	B	D	B	D	B	D
3'	23,17	24,60	23,17	24,60	23,80	24,62	23,17	24,60
3'	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Bakterientrockengewicht: AO-Kultur: 3,6 mg, davon Fermentextrakt
CP " 3,6 " "
TF " 4,2 " "
Kontrolle: 4,0 " "

Tabelle

Man könnte also annehmen, daß bei der durch die Acridinderivate photosensibilisierten Reaktion in erster Linie die prosthetischen Gruppen der Atmungsfermente blockiert werden und so die ausgeprägte Atmungshemmung bewirken. Die ziemlich willkürlich herausgegriffene Transaminasenprüfung reicht jedoch nicht zur Sicherung dieses Schlusses aus.

5. Versuche mit Cytochrom c

Um nachzuprüfen, inwieweit es sich bei diesen Vorgängen letztlich um Oxydation oder Reduktion handelt, schien es angezeigt, Versuche mit Cytochrom c anzustellen, da dieses leicht photometrisch an der Intensität der 550 nm-Bande gemessen werden kann. Da man aber eine derartige photometrische Bestimmung des Cytochrom c bei unseren Bakteriensuspensionen kaum durchführen kann, weil durch den geringen Cytochrom c-Gehalt derselben die Unterschiede zwischen oxydierter und reduzierter Stufe nicht deutlich genug sind, mußten wir zu Modellversuchen mit reinem Cytochrom c greifen (in vitro). Allerdings erlauben uns die Beobachtungen keinesfalls sichere Aufschlüsse über die Vorgänge in der Bakterienzelle selbst, da bekanntlich zwischen Ansätzen dieser Art grundsätzliche Verschiedenheiten in vivo und in vitro bestehen können. In unseren Versuchen lösten wir Cytochrom c in n/50 Phosphatpuffer pH 7, 1 und bestimmten photometrisch seinen Gehalt in g , indem wir einen Teil mit Na-Dithionit auf die reduzierte Stufe brachten, den anderen stark ansäuerten und ihn mehrere Minuten lang mit reinem Sauerstoff oxydierten. Aus der Differenz der beiden Extinktionswerte, gemessen bei der 550 nm-Bande, errechnet sich nach folgender Gleichung¹⁾ der Cytochromgehalt in g :

$$g \text{ Fe/ml} = \frac{\Delta E \cdot 10^{-8} \cdot \text{cm}}{0,62} \quad \begin{array}{l} \Delta E = \text{Extinktionsdifferenz} \\ \text{cm} = \text{Schichtdicke} \end{array}$$

Wir verfahren bei den Untersuchungen analog wie bei den Bestimmungen der Succinodehydrogenasenaktivität und arbeiteten mit verschiedenen Lichtdosen. Bei den einzelnen Messungen, bestrahlt oder dunkel, oxydierten wir jeweils einen Teil des Cytochrom c, den anderen reduzierten wir, nachdem wir den Extinktionswert in Ansatz festgestellt hatten. Belichteten wir eine Cytochrom c-Lösung mit Farbstoffzusatz, so trat nicht, wie man hätte erwarten können, eine Oxydation, sondern eine Reduktion auf (Heraustreten der Absorptionsbanden des Cytochrom c). Das Cytochrom lag um so mehr in reduzierter

1) Der Faktor $\frac{10^{-8}}{0,62}$ errechnet sich nach der Bezieh. $\frac{\Delta E \cdot \text{cm}}{\text{Fe}} = \frac{0,62}{10^{-8}}$

Form vor, je größer die Strahlendosis war. Zunächst verwendeten wir die sehr geringe Fluorochromkonzentration von 1 : 100 000 und erzielten damit bei Belichtung im wirksamen "Blau" schon eine gut erkennbare Reduktion des Cytochroms. Nahmen wir die Acridinfarbstoffe in höherer Konzentration, wie zum Beispiel 1 : 20 000, so wurden die durch die Bestrahlung bewirkten Reduktionen wesentlich deutlicher und betrugen meist mehr als 3/4 des Cytochrom c-Gehaltes. Auch hier zeigte das Acridinderivat CP schon nach geringeren Lichtmengen als AO und TF die maximale Wirkung. Belichtete Cytochromlösungen ohne Zusatz der Photosensibilisatoren wurden nur in ganz geringem Maße reduziert oder verblieben in der vorgegebenen Oxydationsstufe.

Sollte es sich in der Bakterienzelle ebenfalls um eine Reduktion des Cytochrom-eisens und auch der übrigen Fermente, deren Eisen zu einem Valenzwechsel befähigt ist, handeln, so müßte sich diese bestimmt in noch stärkerem Maße auswirken, da die Mengenverhältnisse der eisenhaltigen Fermente in der Bakterienzelle gegenüber dem photosensibilisierend wirkenden Farbstoff wesentlich geringer sind wie in unseren Modellversuchen (Tabelle).

Versuchsansatz: je 2 ml Cytochromlösung, mit n/10 Phosphatpuffer
auf pH 7,1, Belichtung ($i = 2$)
Versuchstemperatur 22° C

0,03 mg Farbstoff, Cytochrom c-Menge in μ

Belicht. zeit	CP		Belicht. zeit	AO		Belicht. zeit	TF	
	Red.	Cyt. g.		Red.	Cyt. g.		Red.	Cyt. g.
0'	4,4	17,6	0'	6,3	17,6	0'	10,9	22,6
7'	9,8	17,6	15'	9,5	17,6	19'	16,8	22,6
18'	10,5	17,6	30'	9,8	17,6	34'	16,9	22,6

Belicht. zeit	K	
	Red.	Cyt. g.
0'	7,1	29,1
35'	8,0	29,1

K = Kontrolle
Red. = Reduziert
Cyt. g. = Cytochrom gesamt

0,1 mg Farbstoff, Cytochrom c-Menge in *g*

Bel. zt.	CP		Bel. zt.	AO		Bel. zt.	TF		Bel. zt.	K	
	Red.	Cyt. g.		Red.	Cyt. g.		Red.	Cyt. g.		Red.	Cyt. g.
0'	12,1	34,7	0'	14,1	33,3	0'	18,8	59,5	0'	11,8	44,9
5'	22,6	34,7	15'	22,5	33,3	15'	32,5	59,5			
30'	33,5	34,7	45'	30,6	33,3	45'	46,9	59,5	40'	11,8	44,9

Bel. zt.	CP	
	Red.	Cyt. g.
0'	14,3	34,7
7'	22,5	34,7
30'	26,7	34,7

K = Kontrolle
 Red. = Reduziert
 Cyt. g. = Cytochrom gesamt
 Bel. zt. = Belichtungszeit

Tabelle

Spektroskopische Untersuchungen von unseren Bakteriensuspensionen, die klären sollten, inwieweit das Cytochrom c bei Farbstoffzusatz und Belichtung reduziert vorliegt, brachten keine eindeutigen Ergebnisse, da die Cytochrombanden selbst bei starker Reduktion mit Na-Dithionit kaum sichtbar waren. Auch bei Hefesuspensionen waren die Unterschiede zwischen oxydierter und reduzierter Stufe des Cytochrom c an den einzelnen Absorptionsbanden spektroskopisch nur schlecht zu erkennen. So konnten keine sicheren Ergebnisse für den Beweis, daß sich die Verhältnisse in der lebenden Zelle mit unseren in vitro-Versuchen vergleichen lassen, erzielt werden.

Ein weiterer Modellversuch, der die photosensibilisierte Reduktion einer Eisen III - Salzlösung zeigen sollte, brachte insofern keinen Erfolg als eine FeCl_3 -Lösung bei der Blaubestrahlung schon ohne Fluorochromzusatz reduziert wurde und eine positive Berlinerblau-Reaktion ergab. - Immerhin geht aus den Modellversuchen mit Cytochrom c hervor, daß die Wirkung der Fluorochrome in einer Photoreduktion bestimmter an der Atmung beteiligter Häminfermente gelegen sein kann.

DISKUSSION

Um nun näher auf die verschiedenen Möglichkeiten der Angriffspunkte dieser photodynamischen Giftwirkung der drei Acridinderivate einzugehen, müssen wir uns nochmals das Schema des Übertragungsmechanismus von SCHENK vor Augen halten: In unserem Falle gehen also die drei Fluoreszenzfarbstoffe bei Bestrahlung im wirksamen "Blau" durch Verlust eines π -Elektronenpaares in "phototropisomere Diradikale" über und addieren molekularen Sauerstoff. Diese entscheidenden Schritte sind gut nachzuweisen, da ja die photodynamische Wirkung nur mit dem Licht, das der Farbstoff selbst absorbiert und bei Zugewinn von Luftsauerstoff vonstattengeht. Ist ein geeigneter Sauerstoffakzeptor zugegen, zum Beispiel Pyrogallol oder Cystein, wird der Sauerstoff abgegeben und das Diradikal geht wieder in seinen ursprünglichen Zustand über. Bei diesem Vorgang dürfte sich demnach der Farbstoff nicht verbrauchen und ebenso keine Fermentschädigungen auftreten, wie wir es auch in unseren Versuchen mit Pyrogallol- oder Cysteinzusatz beobachten konnten. Ist kein geeigneter Sauerstoffakzeptor zugegen, werden die Farbstoffe selbst stark photochemisch unter Sauerstoffaufnahme irreversibel zersetzt und in Gegenwart von Bakterien treten die Fermentinaktivierungen ungehindert auf.

Man könnte sich nun vorstellen, daß der aktivierte Sauerstoff in der Bakterienzelle, besonders bei den eisenhaltigen Atmungsfermenten, deren Eisen zu einem Valenzwechsel fähig ist, Oxydationen hervorruft. Dabei müßte der Farbstoff jedoch immer wieder regeneriert werden, also keine Farbstoffzersetzung erscheinen. In unseren Versuchen dagegen, zeigten sich gerade bei den Wachstumsversuchen stets auch Farbstoffzersetzung, die dieser Auffassung widerspricht. Würde es sich nach unseren Modellversuchen mit Cytochrom c um eine Reduktion der erwähnten Fermentsysteme handeln, müßte der Photosensibilisator ohne Rückreaktion vom Luftsauerstoff oxydiert werden. Tatsächlich konnten wir auch bei belichteten Cytochrom c-Testen eine Farbstoffveränderung, die sich in einer Konzentrationsminderung äußerte, feststellen.

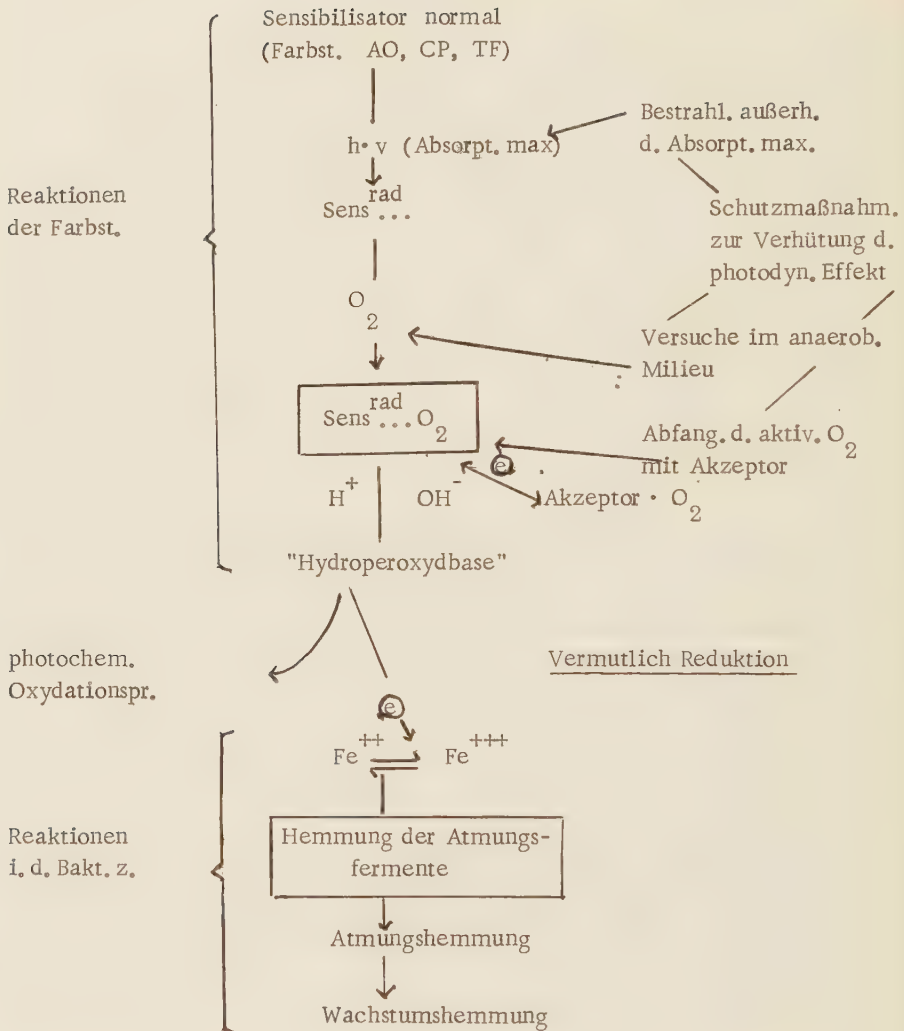


Abb. 25

Schema der chemischen Vorgänge beim photodynamischen Effekt (abgeändert nach SCHENK und für unsere Verhältnisse erweitert).

Die photosensibilisierte Reaktion kann unter gewissen Umständen zu Hydroperoxyden führen. Voraussetzung sind dabei Verbindungen mit isolierten Doppelbindungen. Da aber die von uns verwendeten Acridinderivate diese Bedingung nicht erfüllen, müssen Hydroperoxydbildungen in unserem Falle ausscheiden. Verbindungen der Art $\text{Sens}^{\text{rad}} \cdot \text{O}_2$ können sich jedoch mit den Ionen des Wassers in ein Gleichgewicht zu "Hydroperoxydbasen" setzen. Im Hinblick auf die mutmaßlichen chemischen Eigenschaften dieser "Hydroperoxydbasen" wird man vor allem auf die bekannte Dehydrierbarkeit der Hydroperoxyde durch Fe III-Ionen und anderen Elektronenakzeptoren hinweisen müssen. Zu erwähnen ist zum Beispiel die schon 1937 von HILL unter Entbindung einer Molekel Sauerstoff beobachtete Photoreduktion von Fe^{3+} (-oxalat) zu Fe^{2+} in belichteten Chloroplasten.

Nach unseren Versuchen würde dabei das Eisen des Cytochrom c der Atmungskette oder, was vielmehr anzunehmen ist, das gesamte valenzwechselfähige Fermenteisen für die Dauer der photodynamischen Wirkung blockiert werden. Je geringer die Strahlendosen sind, desto besser kann sich die Bakterienzelle nach der Belichtung wieder erholen. Die nach größeren Lichtmengen auftretenden Enzyminaktivierungen sind meist über lange Zeitabschnitte irreversibel, da alles Fermenteisen blockiert ist. Diese Unterbrechung der Atmungskette wirkt letzten Endes auch auf die übrigen Atmungsvorgänge bis zur Succinodehydrogenase zurück. So tritt mit Belichtungsbeginn die abrupte Atmungshemmung auf, die schließlich die in unseren Ausgangsversuchen beobachtete Wachstums-minderung als Sekundärerscheinung hervorruft. Da diese Hypothese jedoch in keiner Weise als gesichert gelten kann, müssen wir uns begnügen, als Primäreffekt der photodynamischen Giftwirkung der drei Acridinderivate eine Blockierung der an der Atmung beteiligten Fermente zu suchen, ohne dabei einen definierten Reaktionsort angeben zu können.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Vorversuche mit den drei Acridinderivaten AO, CP und TF zeigten, daß sie photodynamisch stark wirksam sind und sich in ihrem grundsätzlichen Verhalten wenig voneinander unterscheiden. Alle drei Farbstoffe absorbieren im Blaulicht am meisten und haben die Fähigkeit, Sauerstoff während einer wirksamen Bestrahlung auf geeignete Akzeptoren zu übertragen, bei deren Abwesenheit sie photochemisch zersetzt werden.
2. Bakterienkulturen von *E.coli* und *Bac. subtilis* wurden im Dunklen bei Farbstoffzusatz nur gering, bei wirksamer Blaubelichtung dagegen stark in ihrem Wachstum gehemmt.
3. Der Stickstoffumsatz wurde nicht in besonderer Weise photodynamisch geschädigt. Der Stickstoffgehalt der Bakterien zeigte ein normales Verhältnis zum jeweils ermittelten Trockengewicht.
4. Der Eiweißstoffwechsel erfuhr nur insofern eine Änderung bei Farbstoffzusatz und Belichtung, als lediglich bei AO-, CP- und TF-Kulturen (hell und dunkel) die Aminosäuren in größerer Quantität in die Nährlösung ausgeschieden wurden. Dies kann zum Teil auf Permeabilitätsänderungen der lebenden Plasmagrenzschicht oder auf Autolyseerscheinungen zurückzuführen sein.
5. Untersuchungen des Gaswechsels ergaben bei AO-, CP-, TF-Kulturen im Dunklen geringe, bei Belichtung mit wirksamem "Blau" rasch einsetzende Atmungsverminderungen. Die Dunkelgiftwirkung der Farbstoffe war in TF- und CP-Kulturen stärker als in AO-Kulturen.
6. Bei Bestrahlungen in anderen Wellenlängenbereichen (Gelb und langwelliges UV) trat keine Atmungshemmung auf. Versuche unter anaeroben Verhältnissen (Gärung *E.coli*) brachten auch bei Blaubestrahlung keine photodynamischen Hemmeffekte.
7. Mit KCN und durch photodynamische Wirkung vergiftete Kulturen von *E.coli* und *Bac. subtilis* zeigten ungefähr dieselben Intensitäten einer Restatmung, die über Flavinenzyme laufen dürfte.
8. AO, CP, TF hemmte im Thunberg-Ansatz die Succinodehydrogenase belichteter *E.coli*- und *Bac. subtilis*-Suspensionen stark, im Dunklen dagegen nicht. Der Grad der Fermentinaktivierung war der eingestrahnten Lichtmenge proportional. Auch sehr geringe Farbstoffgaben waren noch photodynamisch wirksam. Untersuchungen in Stickstoffatmosphäre und bei Zugabe von Sauerstoffakzeptoren (Pyrogallol, Cystein), zeigten bei Farbstoffkulturen während

der Belichtung keine oder nur geringe Inaktivierung der Succinodehydrogenase.

9. Eine mit Hydrochinon zum Teil entkoppelte Atmung von *E. coli* und *Bac. subtilis* wies dieselbe starke Inaktivierung bei Farbstoffzusatz und Belichtung wie die Succinodehydrogenaseaktivität auf. Dabei ist anzunehmen, daß die in unseren Thunberg-Ansätzen beobachtete starke photosensibilisierte Hemmung der Succinodehydrogenase auf deren innigen Bindung an das Cytochromsystem beruht.
10. Untersuchungen der Katalasenaktivität einerseits und Glutamin-Oxalessigsäure Transaminasenaktivität andererseits bei belichteten und dunklen AO-, CP- und TF-Kulturen ließen keine photodynamischen Einflüsse erkennen.
11. Modellversuche mit Cytochrom *c* zeigten bei Farbstoffzugabe und Bestrahlung deutliche REDUKTION des Cytochroms, während es in Dunkelversuchen auf seiner anfänglichen Stufe verblieb. Cytochromlösungen ohne Farbstoffe erfuhren durch die Belichtung keine Veränderungen.
12. Daraufhin wird die Vermutung ausgesprochen, daß die photodynamische Giftwirkung in unseren Versuchen ihre primäre Ursache in einer einseitigen Valenzfestlegung der an der Atmung beteiligten Häminfermente hat.

LITERATURVERZEICHNIS

- BAMANN-MYRBÄCK : Die Methoden der Fermentforschung Bd. 3
S. 2515 ff. Leipzig 1941
- BELOSERSKI, A. u. PROSKURJAKOW, N., J. : Praktikum der Biochemie der
Pflanzen, Berlin 1956
- BOGEN, J. : Anfärbung, Schädigung und Abtötung von Hefe-
zellen durch Acridinorange. Arch. f. Mikrobiol.
18 170-197 (1953)
- Zur Physiologie der Acridinorangewirkung.
Planta 45 325-375 (1955)
- BORCHERT, R. : Bemerkungen zur Fluorochromierung lebend und
toter Zellen mit Acridinorange.
Nat. 37 565 (1950)
- BORCHERT, R. u. HELMCKE, J. : Beobachtung eines photosensibilisierenden
Effekts von Acridinorange bei Paramaecien.
Nat. 38 48 (1951)
- CLARE, N., T. : Photodynamic Action and its Pathological Effects.
In Radiations Biology Vol. III (Hollaender-Alexander)
- CRAMER, F. : Papierchromatographie 4. Auflage, Weinheim 1958
- EDELBACHER, S., LEUTHARDT, F. : Lehrbuch der physiologischen Chemie
S. 235, 499 14. Auflage Berlin 1959
- EPHRUSSI, B. : Induction par l'acridine d'une mutation spécifique
chez la levure. Publ. : Staz. zool. Napoli 22
Suppl. 50-64. Ref. Ber. wiss. Biol. 73 340 (1951)
- EPHRUSSI, B. u. HETTINGER, H. : Direct demonstration of the mutagenic
action of euflavine on baker's yeast.
Nature 166 956 (1950)
- FÖRSTER, T. : Fluoreszenz organischer Verbindungen Göttingen
1951
- GRAFFI et al. : Über die photodynamische Wirkung des Benzpyrens
auf einzelne Fermente der Lebermitochondrien der
Ratte. Nat. 40 414-416 (1953)

- GRAFFI et al. : Über die Wirkung des photodynamischen Effekts auf
Chromobact. violaceum. Nat. 45 321-322 (1958)
- GRAFFI, A., GRAFFI, T. u. WINDISCH, F. : Über die Abhängigkeit der
photodynamischen Wirkung von der Intensität der UV-
Bestrahlung. Experientia 10 68 (1954)
- GILLESPIE, JERMYN, WOODS : Multiple nature of the Enzymes of Aspergillus
orycae and of Horse-radish. Nature 169 487-489 (1952)
- HAITINGER, M. : Fluoreszenz-Mikroskopie. 2. Auflage Akad. Verl. Ges.
Leipzig 1959
- HAGER, A. : Über den Einfluß klimatischer Faktoren auf den Blatt-
farbstoffgehalt höherer Pflanzen. Planta 49 532-533
(1956)
- JOHANNES, H. : Beiträge zur Vitalfärbung von Pilzmycelien I
Flora 134 58 (1939)
- Beiträge zur Vitalfärbung von Pilzmycelien III
Die Vitalfärbung von Phycomyces Blakesleeanus
mit Acridinorange. Arch. f. Mikrobiol. 15 13-41 (1950)
- KANDLER, O. u. ZEHENDER, C. : Papierchromatographische Untersuchung
der Aminosäurezusammensetzung verschiedener
Bakterienhydrolysate. Arch. f. Mikrobiol. 24 41 ff.
(1956)
- LANGENDORFF, H. u. HAGEN, U. : Die Wirkung energiereicher Strahlung
auf die Atmungskette. Experientia 11 485-488 (1955)
- LEDERER, M. u. LEDERER, E. : Chromatography. Els. Publ. Comp. 1957 chpt.
27 p. 235-236 Amsterdam, London, New York,
Princeton 1959
- LEHMANN-NEUMANN : Bakteriolog. Diagnostik II+III München 1927
- LINSKENS, H., F. : Papierchromatographie in der Botanik
Springer Göttingen 1959
- MOHR, H. u. SCHOSSER, G. : Eine Interferenz-Monochromatoranlage für
photobiologische Zwecke. Planta 53 1-17 (1959)
- MYRBÄCK, K. : Enzymatische Katalyse. Einführung in die Enzym-
chemie. S. 132 Berlin 1953

- RAAB, O. : Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien. Z. Biol. 39 524 (1900)
- RAUEN, H. M.: Biochemisches Taschenbuch. S. 984-994 Springer Berlin 1956
- REITZ, K. : Untersuchungen mit photodynamischen Stoffen. Centr.bl. f. Bakt. I. Abt. 45 464 (1908)
- REID, C. : Excited States in Chemistry and Biology. Butterw. Scient. Publ. London 1957
- RIPPEL-BALDES, A. : Grundriß der Mikrobiologie. Berlin-Göttingen 1947
- RONA, P. : Praktikum der physiologischen Chemie I S. 150-152, 381 Berlin 1931
- SALLE, A. J. : Fundamental Principles of Bacteriology. Chpt. 12 New York, Toronto, London 1954
- SCARASCIA VENEZIAN, M. E. : Acridine Orange Action on the Biochemical Metabolism of the Leaf-Tissues of Tobacco Plant. Experientia 11 104-105 (1955)
- SCHENK, G. O. : Zur Theorie der photosensibilisierten Reaktion mit molekularem Sauerstoff. Nat. 35 (1948)
- Reaktionen phototrop-isomerer Diradikale in Natur und Technik. Z.f. Elektrochemie 56 855-868 (1952)
- Aufgaben und Möglichkeiten der präparativen Strahlenchemie. Angew. Chemie 69 579-599 (1957)
- et al. : Darstellung von Hydroperoxyden mittels photo-toxischer Photosensibilisatoren. Liebigs Ann. Chem. 603 46-59 (1957)
- SCHILDMACHER, H. : Über Photosensibilisierung von Stechmückenlarven durch fluoreszierende Farbstoffe. Biol. Zbl. 69 468 (1950)
- SCHLÜTER, M. u. BUKATSCH, F.: Physiol. Untersuchung zur Rassenfrage von Azotobacter. Zbl. f. Bakt., Paras.k., Inf. krankh. u. Hyg. II. Abt. 112 509-543 (1959)

- STICH, H. : Trypaflavin u. Ribonucleinsäuren. Unters. an Mäuseleber, *Condyllostoma* u. *Acetabularia mediterranea*. *Naturwissenschaften*, 38 435 (1952)
- STRUGGER, S. : Fluoreszenzmikroskopie u. Mikrobiologie Hannover 1949
- TAPPEINER, H. v. u. JODLBAUER, A. : Über die Wirkung der photodynamischen Stoffe auf Protozoen und Enzyme. *Deutsche Archiv für klinische Medizin*, 80 427-491 (1904)
- WALLNÖFER, P. u. BUKATSCH, F. : Untersuchungen über den photodynamischen Effekt von Acridinfarbstoffen an *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis*. (Kurzmitteilung) *Naturwissenschaften*, 47 282-283 (1960)
- WARBURG, O. : Wasserstoffübertragende Fermente. Berlin-Dahlem 1948
- Schwermetalle als Wirkgruppen von Fermenten Berlin-Dahlem 1948
- WIEDE, M., MEYER, F. : Über die Toxizität einiger Fluorochrome. *Protokolle der Deutschen Gesellschaft für Biochemie*, 44 342 (1955)
- ZANKER, HELD, RAMMENSEE : Neuere Ergebnisse der Absorptions-, fluoreszenz- und Fluoreszenzabsorptionsgradmessungen am AO^{+} , ein weiterer Beitrag zum Metachromasie-Problem dieses Vitalfarbstoffes. *Zeitschrift für Naturforschung*, 14 b Hft. 12 S. 789 (1960)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Herrn Professor Dr. F. BUKATSCH für die Überlassung des Themas, die stetige, rege Anteilnahme, wie für die beratende Unterstützung danken. Die Arbeiten wurden im Botanischen Institut der Universität München durchgeführt, wofür ich Herrn Professor Dr. L. BRAUNER meinen Dank ausspreche. Ferner bin ich Herrn Dr. F. SCHÖTZ und der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die freundliche Erlaubnis zur Benutzung einer Licht-Warburg-Apparatur, sowie der physikalischen Abteilung der Fa. OSRAM für die Eichung des Thermosäulen-Galvanometersystems verbunden.

LEBENS LAUF

Am 24. September 1936 wurde ich, Peter Wallnöfer als Sohn des Röntgenfacharztes Dr. Alexander Wallnöfer und dessen Ehefrau Margarete geb. Hönig in München geboren. Von 1942 bis 1943 besuchte ich in München die Volksschule an der Südl. Auffahrtsallee. In den Jahren 1944 bis 1945 wurde ich zunächst nach Kärnten, später nach Tegernsee evakuiert. Nach dem Krieg übersiedelte ich wieder nach München und nahm am dortigen Volksschulunterricht teil. Ende 1947, nach der 5. Klasse Volksschule trat ich in die Rupprecht-Oberrealschule in München ein, wo ich 1956 die Reifeprüfung ablegte. Im Wintersemester 1956/57 immatrikulierte ich mich an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität in München, wo ich am 10. Mai 1961 promovierte.

